



Comparaison de la NASBA Panfungi à la culture mycologique pour la détection de la contamination fongique d'un environnement à air maîtrisé

Thomas Berendsen

► To cite this version:

Thomas Berendsen. Comparaison de la NASBA Panfungi à la culture mycologique pour la détection de la contamination fongique d'un environnement à air maîtrisé. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-00955759

HAL Id: dumas-00955759

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00955759>

Submitted on 5 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2014

N°

**Comparaison de la NASBA Panfungi à la culture
mycologique pour la détection de la contamination
fongique d'un environnement à air maîtrisé**

THESE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Par Thomas BERENDSEN

Né le 29 mai 1983 à Toulon

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE*

Le 28 février 2014

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Pr Muriel CORNET

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble.....Président du jury

Pr Hervé PELLOUX

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble.....Membre du jury

Dr Marie-Pierre BRENIER-PINCHART

Maitre de Conférences Universitaires-Praticien Hospitalier

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble.....Directeur de thèse

Dr Jean-Benjamin MURAT

Assistant Hospitalo-Universitaire-Praticien Hospitalier

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble.....Membre du jury

Dr Hafid ABAIBOU

Chercheur Expert Biosciences, R&D Biologie Moléculaire Franchise Pharma, bioMérieux.....Membre du jury

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2013-2014

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=12)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MARTIN	Donald	Laboratoire TIMC-IMAG (UMR 5525 UJF-CNRS)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEURS EMERITES (n=2)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
OUKACINE	Farid	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)

BEDOUCH	Pierrick	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoît	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I/MCU-PH)

PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)

FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
-----------------	---------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=3)

CHANOINE	Sébastien	Pharmacie Clinique (UF-CHU)
GARNAUD	Cécile	Parasitologie-Mycologie
VAN NOLLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DNTP-BGM)

MEDAILLE D'OR D'ANNE D'INTERNAT SUPPLEMENTAIRE (n=2)

BERNARD	Delphine	période de 6 mois – novembre 2013 à avril 2014
GAUTIER	Elodie	période de 6 mois – mai 2014 à novembre 2014

ATER (n= 3)

BRAULT Julie	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
GRAS Emmanuelle	ATER	Physiologie-Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS

BEL	Coraline	(01-10-2012 au 30-09-2014)	
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
BOSSON	Anthony	(01-10-2013 au 30-09-2015)	Laboratoire GIN
CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
CHRISTEN	Aude	(01-10-2013 au 30-09-2015)	DCM
CRESPO	Xenia	(01-10-2013 au 30-09-2015)	LBGE
LECERF-SHMDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Pharmacochimie (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-11-2011 au 31/10.2014)	Laboratoire HP2(JR)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09.2013)	Laboratoire HP2(JR)
OUIDIR	Marion	(01-10-2011 au 30-09-2014)	
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)

Professeur Invité

NURISSO	Alessandra	(01/11/13 au 31/12/2013))
---------	------------	---------------------------

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Pr Muriel CORNET,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury. Recevez également ma reconnaissance pour vos enseignements durant mon stage.

Dr Marie-Pierre BRENIER-PINCHART,

Merci pour le temps que vous avez consacré à la direction de ce travail. Soyez assurée de mon respect pour votre rigueur scientifique et de ma gratitude pour la pertinence de vos nombreux conseils.

Pr Hervé PELLOUX,

Merci de m'avoir accueilli durant deux semestres dans votre service de Parasitologie-Mycoologie où j'ai été sensible au souci que vous portez à l'encadrement et à la formation des internes.

Dr Jean-Benjamin MURAT

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Merci également pour ta disponibilité au sein du service.

Dr Hafid ABAIBOU

Merci pour ta participation à ce jury, ainsi que pour la confiance que m'a témoigné la société bioMérieux en me proposant ce travail.

Je remercie également:

L'équipe MiDASS du centre Christophe Mérieux pour leur accueil. Je remercie particulièrement Frederick LASNET pour son aide durant ce travail.

Merci également au Dr Anne THIEBAUT, à Philippe CANETTO, ainsi qu'à tout le personnel de l'unité d'onco-hématologie de l'hôpital Michallon, qui m'ont autorisé à réaliser l'ensemble des prélèvements nécessaires à cette étude.

Sur un plan plus personnel, je tiens aussi à remercier :

Mes amis pharmaciens, côtoyés sur les bancs de la fac ou ailleurs, qui m'ont accompagné tout au long de ces années d'études: Edouard, Benoit, Riadh, Anne-Sophie, Sébastien, Mathieu, Amélie, Frédéric, Magalie... et les autres.

Tous ceux que j'ai rencontrés lors de mon parcours d'interne, de Marseille à Grenoble, en passant par Voiron et Pointe-à-Pitre, en particulier Sébastien, Vincent, Jérémie, Sylvain, Cécile, Raya et Gautier.

Pour être juste, les remerciements adressés aux personnes suivantes devraient occuper un volume plus important que le présent mémoire. Dans un souci de synthèse, je me contenterai de quelques lignes:

Merci à mes parents,

Pour avoir été toujours présents. Parmi tout ce que vous m'avez apporté, vous m'avez inculqué le sens de l'effort et permis de réaliser ces études. Recevez ce mémoire en témoignage de ma reconnaissance.

Merci à mes frères, Erwin et Jonathan,

Pour tous les moments partagés en famille: passés, présents et futurs.

Merci à Elise, petite tornade Otaku,

Pour ton soutien tout au long de ce travail bien sur, mais surtout pour ton amour et tes attentions permanentes, qui subliment mon quotidien.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Table des figures	6
Table des tableaux	7
Liste des abréviations	9
Introduction	10
Bibliographie	12
1. Contamination fongique de l'environnement	12
1.1. Généralités sur les bioaérosols	12
1.2. Généralités sur le règne fongique	12
1.3. Contamination de l'air intérieur par les bioaérosols.....	13
1.3.1. Conditions de contamination de l'air intérieur.....	13
1.3.2. Principales moisissures et levures rencontrées dans l'air intérieur	14
1.4. Effets sanitaires de la biocontamination fongique.....	20
1.4.1. Environnement et risque fongique associé.....	20
1.4.1.1. Maitrise du risque fongique: enjeu majeur de certains secteurs hospitaliers	21
1.4.1.2. L'exposition fongique au travail, source de maladies professionnelles	23
1.4.1.3. L'exposition fongique dans l'habitat et ses conséquences sur la santé.....	24
1.4.2. Pathologies associées à une exposition fongique.....	25
1.4.2.1. Réactions allergiques	27
1.4.2.2. Effets irritatifs et toxiques de constituants ou de métabolites fongiques	28
1.4.2.3. Infections fongiques	29
2. Méthodes de détection de la biocontamination.....	31
2.1. Méthodes d'échantillonnage.....	32
2.1.1. Méthodes de prélèvements d'air.....	32
2.1.2. Méthodes de prélèvements des surfaces.....	34
2.2. Méthodes de détection et / ou de quantification fongique.....	35

2.2.1.	Détection de spores ou de molécules fongiques.....	35
2.2.2.	Détection de constituants fongiques spécifiques.....	39
3.	La technique NASBA	42
3.1.	Etapes de la technique NASBA.....	42
3.1.1.	Extraction des acides nucléiques	42
3.1.2.	Principe de la NASBA	43
3.1.3.	Initiation de l'amplification et choix des amorces P1 et P2	44
3.1.4.	Détection du signal fluorescent et principe des molecular beacons.....	45
3.1.5.	Validation de l'amplification et choix du contrôle interne	47
3.1.6.	Principaux paramètres de la courbe de fluorescence	47
3.2.	Applications de la NASBA.....	48
3.2.1.	Détection d'agents infectieux.....	48
3.2.1.1.	Détection et quantification de charges virales	49
3.2.1.2.	Diagnostic d'infections bactériennes.....	49
3.2.1.3.	Diagnostic d'infections fongiques	49
3.2.1.3.1.	Diagnostic des candidémies.....	50
3.2.1.3.2.	Diagnostic des aspergilloses invasives	50
3.2.2.	Etude de viabilité des micro-organismes	51
3.2.3.	Détection d'agents non infectieux.....	52
3.3.	Evaluation de la NASBA Panfungi de bioMérieux.....	52
Objectifs de l'étude		54
Matériels et méthodes.....		56
1.	Présentation du service d'hématologie	56
2.	Points de prélèvements	56
2.1.	Zone 1	57
2.2.	Zone 2.....	57
2.3.	Zone 3	58
3.	Réalisation des prélèvements	59
3.1.	Réalisation des prélèvements de surfaces.....	59
3.2.	Réalisation des prélèvements d'air	60
4.	Traitement des prélèvements	62

4.1.	Mise en culture des prélèvements et identification fongique	62
4.2.	Traitement des échantillons par biologie moléculaire	63
4.2.1.	Lyse des particules et extraction des acides nucléiques	63
4.2.2.	Amplification des extraits d'acides nucléiques	64
5.	Expression des résultats	69
5.1.	Evaluation de la détection fongique	69
5.2.	Comparaison entre les deux techniques.....	69
Résultats	71
1.	Résultats de la culture fongique	71
1.1.	Prélèvements en zone 1	71
1.2.	Prélèvements en zone 2	72
1.3.	Prélèvements en zone 3	72
1.4.	Identification fongique	73
2.	Résultats de la détection fongique par NASBA et comparaison à la culture.....	74
2.1.	Résultats de la NASBA	74
2.2.	Comparaison qualitative: évaluation de la concordance entre la NASBA et la culture fongique	74
2.2.1.	Evaluation de la concordance des prélèvements de surfaces	75
2.2.1.1.	Calcul des taux de concordance	75
2.2.1.2.	Calcul du degré d'accord Kappa	76
2.2.2.	Evaluation de la concordance des prélèvements d'air	77
2.2.2.1.	Calcul des taux de concordance	77
2.2.2.2.	Calcul du degré d'accord Kappa	78
2.3.	Comparaison quantitative	79
2.4.	Synthèse des principaux résultats	81
Discussion	83
Conclusion	92
Références bibliographiques	94
Annexes	110

Table des figures

Figure 1: <i>Cladosporium</i> sp sur gélose Sabouraud et blastospores présentant des renforcements de coloration à leurs extrémités.....	15
Figure 2: Dictyospores d' <i>Alternaria</i> sp	16
Figure 3: <i>Penicillium</i> sp avec conidiophore monoverticillé caractéristique	17
Figure 4: Organisation d'une tête aspergillaire.....	17
Figure 5: <i>A. fumigatus</i> , culture sur gélose Sabouraud et têtes aspergillaires	18
Figure 6: Culture sur gélose Sabouraud de <i>Fusarium moniliforme</i> et microconidies de <i>Fusarium oxysporum</i>	19
Figure 7: <i>Rhizopus</i> sp, culture et aspect microscopique.....	20
Figure 8: Observations microscopique et tomodynamométrique de lésions pulmonaires associées à une aspergillose invasive..	30
Figure 9: Observations macroscopique et tomodynamométrique de lésions pulmonaires associées à un aspergillome.....	31
Figure 10: Principe de l'échantillonnage des bioaérosols par la méthode d'impaction	33
Figure 11: Etapes de la culture fongique.....	36
Figure 12: Protocole de quantification de la flore fongique viable par cytométrie en phase solide	37
Figure 13 : Méthodes de détection de la flore fongique environnementale	41
Figure 14: Principe de l'amplification NASBA	44
Figure 15: Caractéristiques du couple d'amorces P1 et P2 idéal	45
Figure 16: Principe d'une sonde molecular beacon	46
Figure 17: Modélisation d'une courbe de fluorescence NASBA et représentation théorique du taux d'ARN correspondant.....	48
Figure 18: Chambre stérile du service d'hématologie	57
Figure 19: Office infirmier du service d'hématologie.....	57
Figure 20: Hall du 5 ^e étage du CHU (Bâtiment A. Michallon)	58
Figure 21: Prélèvement par écouvillonnage.....	59
Figure 22: Applicateur et gélose contact.....	60
Figure 23: Bio-impacteur Air idéal	61
Figure 24: Bio-impacteur MASS	61
Figures 25a et 25b: Extracteur POP 1 et dispositif de fixation du <i>pepper mill</i>	63
Figure 26: Automate d'amplification Nuclisens Easy Q [®]	68
Figure 27: Schéma de traitement des prélèvements	68
Figure 28: Répartition des principales souches identifiées sur les milieux de culture.....	73
Figure 29: Représentation de la charge fongique moyenne évaluée sur les surfaces en zones 1 et 2 en UFC /25cm ² (+/-SD) et en Geq /25cm ² (+/- SD).....	80
Figure 30: Représentation de la charge fongique moyenne évaluée dans l'air en zones 1 et 2 en UFC /m ³ (+/-SD) et en Geq /m ³ (+/- SD)	81

Table des tableaux

Tableau I: Classes particulières suivant la norme NF EN ISO 14644-1	22
Tableau II: Classification de la propreté particulière de l'air des établissements de santé.....	22
Tableau III: Synthèse de 3 méta-analyses étudiant les effets de l'humidité et des moisissures dans les logements sur la santé humaine	25
Tableau IV: Pathogénicité des principales moisissures de l'environnement	26
Tableau V: Exemples d'agents infectieux détectés par des méthodes NASBA et cibles moléculaires associées	51
Tableau VI: Répartition des points de prélèvement par campagne.....	58
Tableau VII: Amorces utilisées lors de l'amplification par NASBA Panfungi	65
Tableau VIII: Protocole de préparation du mix réactionnel.....	65
Tableau IX: Protocole de préparation de la solution d'enzyme	65
Tableau X: Exemple de répartition des extraits dans les puits réactionnels	67
Tableau XI: Modélisation des résultats de détection fongique par culture et par NASBA	69
Tableau XII: Interprétation du coefficient Kappa, selon Landis et Koch	69
Tableau XIII: Modélisation des résultats de détection fongique par culture et par NASBA, avec prévalence identique des événements positifs et négatifs.....	70
Tableau XIV: Taux de prélèvements positifs évalués par la culture et moyenne du nombre de colonies (UFC +/- SD) en fonction de la zone prélevée	72
Tableau XV: Taux de prélèvements positifs évalués par NASBA et moyenne du nombre de colonies (UFC +/- SD) en fonction de la zone prélevée.	74
Tableau XVI: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture, sur les prélèvements de surfaces en zone 1	75
Tableau XVII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture, sur les prélèvements de surfaces en zone 2	75
Tableau XVIII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture, sur les prélèvements de surfaces en zone 3	75
Tableau XIX: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur l'ensemble des prélèvements de surfaces	75
Tableau XX: Evaluation de l'accord entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements de surfaces (ensemble des trois zones)	76
Tableau XXI: Evaluation de l'accord ajusté au biais de prévalence entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements de surfaces.....	77
Tableau XXII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air en zone 1	77
Tableau XXIII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air en zone 2	77
Tableau XXIV: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air en zone 3	77
Tableau XXV: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur l'ensemble des prélèvements d'air	78

Tableau XXVI : Evaluation de l'accord entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air (ensemble des trois zones).....	78
Tableau XXVII: Evaluation de l'accord ajusté au biais de prévalence entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air	79
Tableau XXVIII : Nombre de prélèvements positifs sur l'ensemble de l'étude (en zones 1 et 2).....	79

Liste des abréviations

AAE	Alvéolite Allergique Extrinsèque
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMV-RT	Transcriptase Reverse du Virus de la Myéloblastose Aviaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
BPCO	Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
COVm	Composés Organiques Volatils microbiens
ERMI	Environmental Relative Moldiness Index
ESA	Agence Spatiale Européenne
FAM	Carboxyfluoresceine
Geq	Génome équivalent
GBEA	Guide de Bonne Exécution des Analyses
HEPA	High Efficiency Particulate Air ou Filtre absolu à haute efficacité
MiDASS	Microbial Detection in Air System for Space
MSR	Maximal Signal Ratio
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
P1	Amorce P1
P2	Amorce P2
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNaseH	Ribonucléase H
ROX	Carboxy-X-rhodamine
Rpm	Rotations par minute
Sd	Standard deviation ou Ecart type
T7 DdRp	T7 DNA-dependant RNA polymerase
UFC	Unité Formant Colonie
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction

« *Le microbe n'est rien, le terrain est tout* ». Si cette citation d'un des précurseurs de la microbiologie, Antoine Béchamp, pharmacien du 19^{ème} siècle, souligne l'importance de la notion de défenses (biologiques ou mécaniques) de l'hôte dans la survenue d'une infection d'un individu par un micro-organisme, elle illustre également la nécessité de maîtriser la contamination microbiologique d'un environnement hébergeant des personnes dont l'immunité serait altérée (1–9).

Lorsque les conditions propices à la croissance fongique sont présentes en milieu intérieur (hospitalier ou domestique) et qu'elles ne sont pas contrôlées, les moisissures peuvent proliférer, coloniser divers substrats et disséminer leur spores dans l'air ambiant (1,6,10–15). Cette flore fongique environnementale expose les individus à un ensemble nosologique très large, comprenant des effets irritatifs, immunologiques, toxiques et infectieux. Ceux-ci dépendent du mode et de l'importance de l'exposition, de la nature de l'agent en cause et de la susceptibilité des individus exposés (1,2,7,9,16,17).

Dans les établissements de santé, la surveillance microbiologique de l'environnement représente un des axes de la politique de lutte contre les infections nosocomiales (18,19). Une stratégie de contrôles environnementaux est définie par chaque Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN). Après analyse des risques, celui-ci cible des zones de prélèvements prioritaires, adaptées aux différentes situations.

La gestion de l'aéro-biocontamination et de l'exposition fongique en particulier est également primordiale dans le domaine aérospatial. Une exposition fongique prolongée dans l'air intérieur des navettes spatiales aurait des effets délétères en terme écologique, sur les matériels et sur les spationautes, dont l'immunité est altérée pendant les vols (20–23). Dans ce contexte, l'Agence Spatiale Européenne (ESA) a confié au laboratoire bioMérieux le développement du projet MiDASS. Ce projet prévoit la mise au point d'une trousse automatisée de détection de la flore bactérienne et fongique environnementale par biologie moléculaire. L'objectif est de bénéficier d'un outil spécifique, d'interprétation facile, plus sensible et plus rapide que les techniques de détection classiques.

Le développement des techniques de biologie moléculaire dans le domaine environnemental est encore assez limité. En revanche, elles sont largement utilisées dans le domaine médical et permettent une aide au diagnostic ou au suivi biologique. Parmi ces techniques, la NASBA est une technologie de détection et d'amplification des acides nucléiques mise au point en 1991 par Jean Compton (24).

La société bioMérieux a développé, dans le cadre du projet MiDASS, une NASBA Panfungi permettant l'amplification d'une séquence nucléotidique commune au règne fongique: l'ARNr 28S. Dans les secteurs dits « protégés » dans lesquels la contamination biologique doit être faible ou nulle et l'environnement régulièrement contrôlé, la détection de cette séquence permettrait la mise en œuvre rapide d'actions correctives.

Après quelques rappels sur l'aéro-contamination fongique et ses effets en termes de santé humaine, nous passerons en revue les principales méthodes d'échantillonnage de l'air et des surfaces, ainsi que les différentes techniques d'évaluation de la charge fongique d'un environnement, puis nous présenterons la technologie NASBA Panfungi et ses applications.

Dans un second temps, nous décrirons le travail réalisé dans le cadre de cette étude, dont l'objectif était d'évaluer les performances de la NASBA Panfungi dans la détection de la contamination fongique d'un secteur à air maîtrisé (secteur hospitalier, unité d'hématologie) et de les comparer à la culture mycologique.

Pour cela, douze campagnes de prélèvements de surfaces et onze de prélèvements d'air ont été réalisées dans l'environnement hospitalier. Trois zones de prélèvements ont été choisies: une zone à charge fongique supposée quasi nulle (pour être proche de l'écologie des stations spatiales), une zone à contamination faible et une zone fortement contaminée.

Pour chaque point de prélèvement, deux échantillonnages ont été effectués: l'un a été traité en biologie moléculaire et analysé par la NASBA Panfungi au centre Christophe Mérieux (bioMérieux), l'autre a été mis en culture sur un milieu adapté à la croissance des spores fongiques au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble. Une comparaison qualitative a ensuite été effectuée entre les deux méthodes.

Enfin, après avoir présenté les résultats de ce travail, ils seront discutés et comparés aux études parues dans la littérature.

Bibliographie

1. Contamination fongique de l'environnement

1.1. Généralités sur les bioaérosols

Les aérosols biologiques ou bioaérosols peuvent se définir comme des particules d'origine microbienne en suspension dans l'air. Ces biocontaminants sont composés de structures viables et non viables. Les particules viables contiennent les cellules ou spores bactériennes, les fragments de mycélium et spores fongiques, les cellules ou les kystes de protozoaires. Les particules non viables sont composées de fragments cellulaires ou de métabolites microbiens (endotoxines, mycotoxines...) (25,26).

Les bioaérosols sont de composition variable, d'origine naturelle ou liés à l'activité de l'homme. Ils sont caractérisés par leur taille, leur forme et leur densité. Ces paramètres physico-chimiques, ainsi que des facteurs environnementaux (humidité, température, ventilation), déterminent leur capacité d'aérosolisation (15,26,27). La taille de ces particules varie de 0,3 à 100 μm . Les particules de moins de 5 μm de diamètre, majoritaires, restent en général en suspension dans l'air, alors que les particules de plus grande taille se déposent sur les surfaces (26,27).

1.2. Généralités sur le règne fongique

Le règne des champignons comporte plusieurs dizaines de milliers d'espèces de moisissures et de levures (1,2,4–6,27–33). Ces organismes eucaryotes peuvent être des saprophytes primaires ou des parasites. Ils sont généralement aérobies, hétérotrophes pour le carbone et l'azote et chimiotrophes. Ubiquitaires, ils peuvent se développer sur tout milieu possédant l'eau et les substances nécessaires à leurs propres synthèses (1).

Les levures sont des organismes unicellulaires qui se divisent par scission ou bourgeonnement (reproduction asexuée). Les moisissures constituent un groupement hétérogène au sein du règne fongique. La plupart appartiennent à l'ordre des Deuteromycota. Organismes

pluricellulaires, les moisissures se reproduisent par sporulation et se développent par des filaments appelés hyphes qui en s'agglomérant constituent le mycélium (1,4,30). Celui-ci, en se développant, donne naissance à des structures plus spécialisées: les appareils sporifères. Ces structures sont responsables de la formation de spores, dont le rôle est double. D'une part leur métabolisme réduit leur permet d'assurer la préservation du champignon à l'état latent, pendant plusieurs années (1,3,27,29,34). D'autre part, leur petite taille favorise leur dispersion par l'air, l'eau ou d'autres vecteurs (insectes, acariens, homme...), permettant la propagation de l'espèce fongique dans l'environnement. En conditions favorables (substrat, humidité), les spores peuvent germer et donner un nouveau mycélium, qui pourra à son tour se développer et sporuler (1,29).

1.3. Contamination de l'air intérieur par les bioaérosols

1.3.1. Conditions de contamination de l'air intérieur

La présence de bioaérosols dans l'air intérieur est principalement due aux particules provenant de l'air extérieur, à l'homme et ses activités, aux matériaux de construction et aux mobiliers. Diverses « niches écologiques », réservoirs de spores de moisissures et de levures, sont également retrouvées au niveau des systèmes de ventilation et des zones en travaux (35). De nombreux paramètres environnementaux influencent la croissance fongique.

1.3.1.1. Influence de la température

Les moisissures présentes dans l'environnement intérieur sont majoritairement mésophiles: leur croissance est optimale à une température proche de celle des locaux. Leur large gamme de température de croissance leur procure un avantage compétitif par rapport aux autres micro-organismes. C'est notamment le cas d'*Aspergillus fumigatus*, qui peut se développer entre 12 et 52 °C (1,17,17,30,32,33,36,37).

1.3.1.2. Influence de la composition des substrats

La colonisation des matériaux par les moisissures induit leur biodégradation, par deux mécanismes différents: dégradation physique liée au développement des hyphes et

dégradation chimique imputable à la production de divers métabolites fongiques. Les supports celluloseux présents dans les constructions (papier et colle en surface du placoplâtre, tuiles cartonnées, matériaux de recouvrement agglomérés) constituent des composés facilement dégradables par les moisissures et d'excellents supports de croissance (1,16,27,30).

1.3.1.3. Influence de l'humidité

Dans les environnements intérieurs, les éléments nutritifs sont assez abondants et la température généralement modérée. Dans les environnements à hygrométrie faible, l'eau constitue souvent le facteur limitant pour la germination des spores et le développement fongique. A l'inverse, les milieux humides sont plus fréquemment colonisés par les moisissures (1,14). Les causes d'humidité intérieure sont nombreuses: fuite d'eau, défaut d'isolation et de ventilation provoquant une condensation sur les surfaces, activités humaines (1,5)...

1.3.1.4. Nature de l'espèce considérée

La capacité d'aérosolisation des spores fongiques à partir du support de croissance est également liée à la nature de l'espèce considérée. Certaines spores rugueuses et légères peuvent se maintenir plusieurs heures dans l'air (*A. fumigatus*), alors que d'autres spores, lisses et plus lourdes (*A. niger*), retombent et se déposent plus rapidement sur les surfaces. La viscosité de la paroi intervient également dans l'aérosolisation des spores fongiques. Les spores de *Stachybotrys* spp ou *Fusarium* spp, visqueuses, auront davantage de difficulté à être décrochées de leur support que des spores plus sèches (*A. fumigatus*, *Penicillium* sp) (1,38). Afin de s'affranchir au mieux de ces paramètres, l'évaluation de la contamination fongique environnementale doit donc être réalisée à la fois par des prélèvements d'air et des prélèvements de surfaces (1,39,40).

1.3.2. Principales moisissures et levures rencontrées dans l'air intérieur

Plusieurs milliers d'espèces de moisissures sont capables de disséminer leurs spores par voie aérienne et sont présentes en permanence dans notre environnement. Une trentaine de genres différents sont observés de façon régulière dans les espaces intérieurs. Les différentes

enquêtes épidémiologiques révèlent que les spores les plus fréquemment retrouvées en environnement tempéré sont par ordre décroissant de fréquence: les spores de *Cladosporium* sp (20-30%), d'*Alternaria* sp (9-18 %), de *Penicillium* sp (6-8%) et d'*Aspergillus* sp (1-5 %) (30,37).

1.3.2.1. *Cladosporium* sp

Les espèces du genre *Cladosporium* sont très fréquemment rencontrées dans le sol, sur de nombreux végétaux et dans l'air ambiant (1,29). Fréquents contaminants de laboratoire, elles sont parfois à l'origine de mycoses opportunistes. De plus, l'exposition prolongée aux spores de *Cladosporium* peut être responsable de manifestations allergiques (41). Les colonies ont une texture veloutée ou floconneuse. Leur couleur varie du vert olive au brun-noir. Microscopiquement, on observe des hyphes pigmentés. Les conidies produites présentent souvent aux extrémités des cicatrices de bourgeonnement (30).

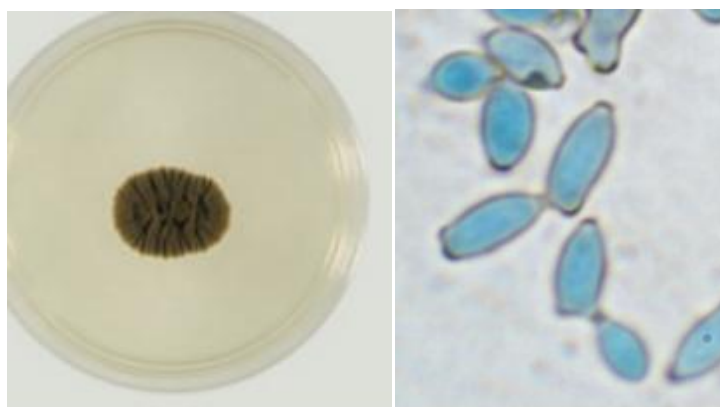


Figure 1: *Cladosporium* sp sur gélose Sabouraud (à gauche) et blastospores présentant des renforcements de coloration à leurs extrémités (à droite) (30)

1.3.2.2. *Alternaria* sp

Le genre *Alternaria* regroupe un ensemble d'espèces très répandues, fréquemment saprophytes ou parasites de plantes. Peu pathogènes chez l'immunocompétent (parfois responsables d'onychomycoses), elles peuvent causer des infections diverses chez l'immunodéprimé (infections cutanées, sous-cutanées ou profondes) (5,30). Les colonies, duveteuses, prennent rapidement une teinte vert foncée à noire. Microscopiquement, ce genre

se distingue par un mycélium septé brun et l'émission de dictyospores: conidies brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec. A maturité, les dictyospores présentent des cloisons transversales et longitudinales (1,30).

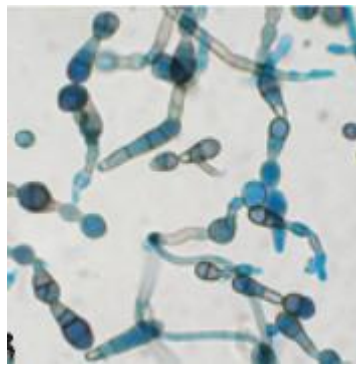


Figure 2: Dictyospores d'*Alternaria* sp (30)

1.3.2.3. *Penicillium* sp

Saprophytes très répandus dans l'environnement, à l'origine notamment de la dégradation de denrées alimentaires, ces champignons sont des contaminants fréquents de laboratoire. Le genre *Penicillium* comporte environ 230 espèces, exceptionnellement responsables de mycoses systémiques, à l'exception de *Penicillium marneffei* qui peut s'avérer un redoutable opportuniste chez l'individu immunodéprimé (42–44). Leur croissance sur milieu Sabouraud sans cycloheximide est rapide, donnant des colonies duveteuses, poudreuses, de couleur variable. Microscopiquement, on distingue des conidiophores émettant des phialides disposées en verticilles, l'ensemble donnant une image caractéristique de pinceau. Les conidies émises sont rondes à ovoïdes, de 2 à 4 μm de diamètre et sont facilement véhiculées par l'air (29).



Figure 3: *Penicillium* sp avec conidiophore monoverticillé caractéristique (30)

1.3.2.4. *Aspergillus* sp

Le genre *Aspergillus* regroupe 250 espèces de moisissures cosmopolites très répandues dans le milieu extérieur, dont une dizaine se rencontre fréquemment dans l'habitat. Champignons ubiquistes, appartenant à la classe des Ascomycètes, ils sont retrouvés aussi bien en milieu rural (silo à grains, foin, paille tassée et humide, matière organique en décomposition) qu'en milieu urbain. On les retrouve également fréquemment à l'intérieur des habitations (plantes en pots, conduits d'aération, faux plafonds...) (1,16,30,45). *A. fumigatus* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine (responsable de 80 à 90 % des aspergilloses). Par ordre de fréquence décroissant sont également impliqués en pathologie: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* et *Aspergillus nidulans* (36,37,46–48).

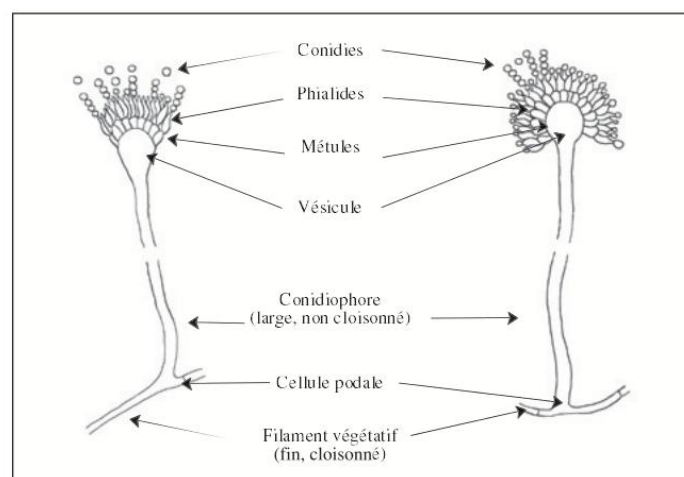
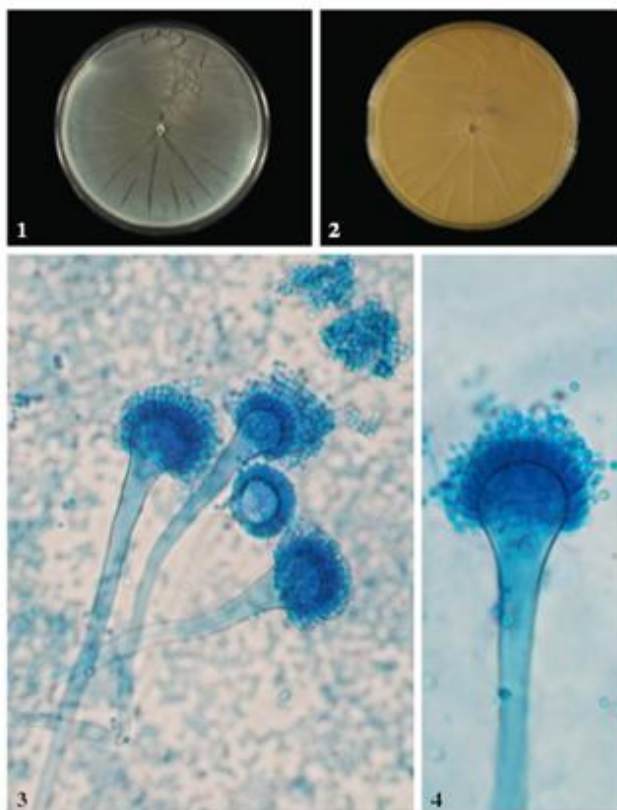


Figure 4: Organisation d'une tête aspergillaire (9)

Le genre *Aspergillus* se caractérise par l'observation microscopique de « têtes aspergillaires ». Constitués de conidiophores et terminés par une vésicule entourée de phialides, ces organes de sporulation permettent une reproduction asexuée de type blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex d'une série de spores (conidies). Les espèces aspergillaires se différencient par un ensemble de critères macroscopiques et microscopiques dont la vitesse de pousse, l'aspect et la couleur des colonies, la taille du conidiophore et de la vésicule, l'organisation des phialides, la présence de métules (1,29,30)...



A. fumigatus, agent le plus fréquent des aspergilloses humaines, se distingue par la couleur de ses colonies, bleu vert puis vert foncé à maturité, un conidiophore court (300 μ m) et des têtes unisériées en colonnes compactes.

Figure 5: *A. fumigatus*, culture sur gélose Sabouraud (1 et 2) et têtes aspergillaires (3 et 4) (30)

1.3.2.5. *Fusarium* sp

Champignons cosmopolites saprophytes, la plupart des espèces du genre *Fusarium* peuvent produire des toxines pouvant être à l'origine de pathologies variées chez l'homme (mycotoxicooses). Sur milieu Sabouraud sans cycloheximide, les colonies sont cotonneuses, de couleur variable selon les espèces. Les phialides peuvent produire des macroconidies pluricellulaires fusiformes et des microconidies unicellulaires allongées ou ovales (1,29,30).

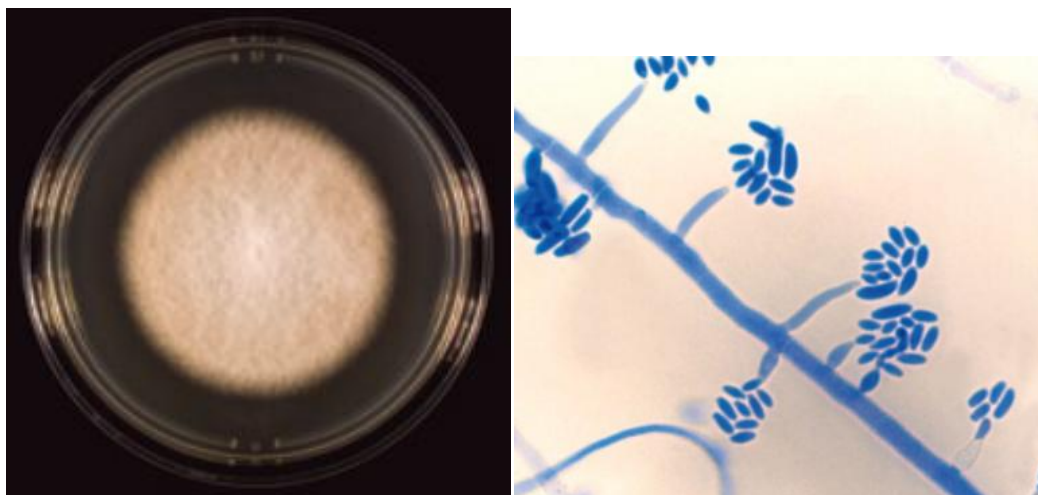


Figure 6: Culture sur gélose Sabouraud de *Fusarium moniliforme* (à gauche) et microconidies asymétriques, légèrement incurvées, disposées en amas, de *Fusarium oxysporum* (à droite) (30)

1.3.2.6. Les mucorales

Les mucorales sont des champignons cosmopolites de la classe des zygomycètes. Ils sont très répandus dans l'environnement comme saprophytes du sol, des végétaux, des céréales ou des excréments. Pathogènes opportunistes, ils peuvent être à l'origine d'un ensemble nosologique large et redoutable, les zygomycoses: atteintes rhinocérébrales, cutanées (diabétiques, grands brûlés) et viscérales (49,50). D'une manière générale, la croissance en culture sur milieu Sabouraud (sans cycloheximide) est rapide et extensive. Les colonies présentent un développement aérien important et envahissent rapidement la boîte de culture. Microscopiquement, le thalle est constitué de filaments non cloisonnés, de diamètre large (5-15 μm) et irréguliers. On peut distinguer des sporocystes, organes de reproduction, dont la partie antérieure se dilate en une vésicule, la columelle. A maturité, les spores sont émises par déchirement du sporocyste (30).

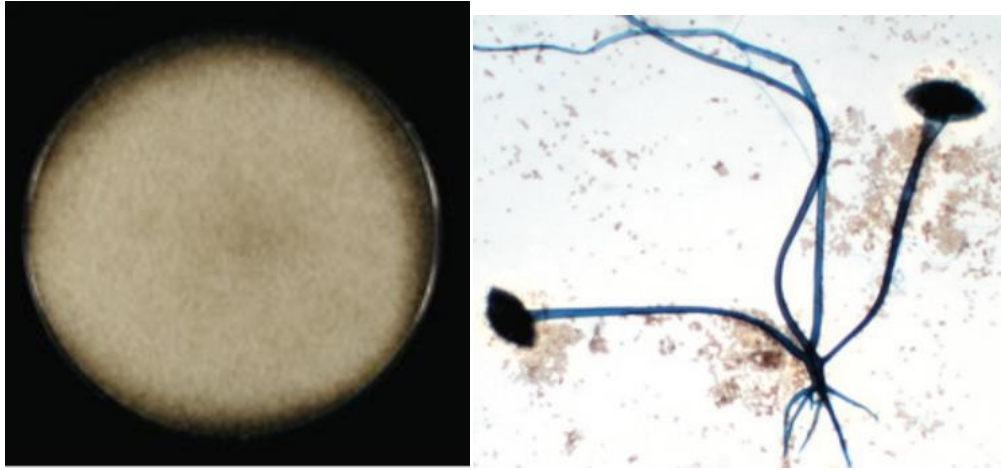


Figure 7: *Rhizopus* sp, culture (gauche) et aspect microscopique (droite) (30)

1.4. Effets sanitaires de la biocontamination fongique

Les effets de l'exposition aux moisissures varient fortement selon le contexte environnemental et les populations exposées. Pour certaines pathologies (infections fongiques profondes, réactions d'hypersensibilité), le rôle des moisissures est indéniable, mais touche une population très restreinte. A l'inverse, pour d'autres affections touchant plus largement une population (rhinite, exacerbation d'asthme, syndrome des bâtiments malsains) le rôle des moisissures n'est pas toujours établi avec certitude.

1.4.1. Environnement et risque fongique associé

Selon le degré de vulnérabilité des individus exposés, certains micromycètes peuvent se révéler pathogènes à des niveaux de concentration extrêmement faibles, alors que d'autres peuvent représenter des risques lorsqu'ils sont présents à des niveaux beaucoup plus élevés (1,2,7–9,51–53). Ce phénomène est observé dans différents environnements intérieurs où le risque fongique représente une préoccupation de santé publique: l'hôpital, l'environnement au travail et l'environnement domestique.

1.4.1.1. Maitrise du risque fongique: enjeu majeur de certains secteurs hospitaliers

Les infections fongiques hospitalières sont généralement provoquées par des champignons opportunistes, survenant sur terrain débilisé. Le risque de développer une infection fongique profonde est fonction de l'état d'immunodéficience de l'hôte et de facteurs exogènes liés à l'environnement. La neutropénie constitue un facteur de risque majeur: celui-ci augmente si le taux de polynucléaires neutrophiles est inférieur à 500 par mm³ pendant deux semaines ou inférieur à 100 par mm³, quelle qu'en soit la durée (54–56). D'autres facteurs de risque liés à l'hôte sont reconnus: les déficits immunitaires sévères (congénitaux ou acquis), la corticothérapie prolongée, la colonisation fongique des voies aériennes supérieures et / ou inférieures, le port de cathéter (15,36,37,46–49,55,57–62)... Les patients dont l'immunité est altérée ont donc un risque accru de développer une infection fongique profonde. En établissement hospitalier, ce risque concerne majoritairement les patients en aplasie médullaire d'onco-hématologie, ainsi que ceux allo-greffés, brûlés ou transplantés d'organe solide.

Dans les environnements intérieurs, des réservoirs fongiques sont fréquemment retrouvés: les filtres, les bouches d'aération, les climatiseurs, la poussière contenue dans les espaces situés au dessus des faux plafonds constituent les éléments les plus contaminés (16). Le développement de l'infection chez l'immunodéprimé survient généralement après inhalation de spores fongiques, véhiculées par l'air (63). Dans les unités de soins, l'homme est le principal émetteur de bioaérosols. L'ensemble des activités autour du patient, d'ordre médical, paramédical, ou encore les visites des proches, constituent des vecteurs potentiels de spores fongiques (14,35,64).

Le pronostic des infections fongiques profondes survenant chez les patients immunodéprimés, telles que les aspergilloses invasives, les zygomycoses ou les fusarioses, est très défavorable, avec une mortalité évaluée de 50 à 90 % (15,65–67). Ainsi, au sein de chaque établissement de soins, une stratégie de maîtrise et d'évaluation du risque fongique vis-à-vis des patients très vulnérables est mise en œuvre. Outre une réduction de la morbidité et de la mortalité de ces infections, l'objectif est également de réduire la consommation de soins associés à ces infections (diminution de la durée d'hospitalisation, de la prescription d'examens complémentaires et de la consommation d'antifongiques) (1,9,15,19,43,48,52,60,61,68–72). L'hospitalisation en secteurs dits protégés, théoriquement exempts de toute flore fongique, constitue l'élément majeur de cette maîtrise. L'architecture des locaux (chambres

individuelles séparées de l'unité par un sas) et un système de filtration de haute efficacité HEPA (filtration de particules $<0.3 \mu\text{m}$) permettent de limiter la contamination microbiologique et chimique de l'air. Des mesures complémentaires sont mises en place afin d'optimiser cette protection: cascade de pressions positives entre la chambre du patient et l'extérieur (permettant de limiter la contamination exogène), contrôle des entrées du personnel, filtration de l'eau et désinfection régulière des surfaces.

La norme NF S90351 (norme spécifique aux établissements de santé, élaborée à partir de la norme ISO 14644-1 sur la classification particulaire de l'air), établit une classification des secteurs en fonction de la concentration et de la taille des particules l'air (71). Les chambres hébergeant des patients neutropéniques sont considérées comme des secteurs à haut risque infectieux et doivent respecter la classification ISO 7 au minimum.

Classe	Concentration maximale admissible (particules / m ³ d'air) en particules de taille égale ou supérieure à celle donnée ci-dessous					
ISO (N)	0,1 μm	0,2 μm	0,3 μm	0,5 μm	1 μm	5 μm
ISO 1	10	2	-	-	-	-
ISO 2	100	24	10	4	-	-
ISO 3	1 000	237	102	35	8	-
ISO 4	10 000	2 370	1 020	352	83	-
ISO 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
ISO 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
ISO 7	-	-	-	352 000	83 200	2 930
ISO 8	-	-	-	3 520 000	832 000	29 300
ISO 9	-	-	-	35 200 000	8 320 000	293 000

Tableau I: Classes particulaires suivant la norme NF EN ISO 14644-1(71)

Zone	4	3	2	1
Risque	Très haut	Haut	Modéré	Faible ou négligeable
Classe particulaire	ISO 5	ISO 7	ISO 8	
Classe de cinétique de décontamination particulaire à 0,5 μm	CP10 < 10 mn	CP20 < 20 mn	CP20 < 20 mn	

Tableau II: Classification de la propreté particulaire de l'air des établissements de santé selon NF S 90351(74)

Des protocoles de surveillance environnementale permettent d'évaluer l'efficacité des stratégies de prévention mises en place. En onco-hématologie, aucune colonie de moisissure ne doit être détectée dans l'air ou sur les surfaces (18,19,75). De plus, les mesures de protection et la fréquence des contrôles nécessitent d'être renforcées lors de périodes de travaux de rénovation, d'entretien ou de modification des bâtiments qui provoquent une remise en suspension des spores dans l'air et accroissent le risque fongique (16,72). Pour ces structures à haut risque infectieux, la maîtrise de l'exposition des patients aux contaminants microbiologiques nécessite donc des méthodes performantes d'évaluation de la charge fongique environnementale, capables de détecter des niveaux de contamination très faibles.

Au CHU de Grenoble, la stratégie de lutte contre les infections fongiques invasives s'articule autour de plusieurs axes dont les principaux sont:

- l'hospitalisation en unité d'onco-hématologie, secteur à air maîtrisé
- un contrôle mensuel de l'aéro-biocontamination par des prélèvements d'air et de surfaces (réalisés par l'unité d'hygiène hospitalière)
- une surveillance épidémiologique, réalisée par l'intermédiaire de la « cellule aspergillose »: réunion pluridisciplinaire mensuelle permettant de recenser les nouveaux cas d'aspergilloses invasives et d'évaluer l'origine probable de la contamination (communautaire, nosocomiale ou d'origine non déterminée) (73)
- une chimioprophylaxie par posaconazole, administrée en prévention primaire aux patients considérés à risque de développer une infection fongique invasive (60).

1.4.1.2. L'exposition fongique au travail, source de maladies professionnelles

Certaines catégories de travailleurs peuvent être particulièrement exposées à de fortes concentrations en moisissures. Que ce soit par le biais de réactions immunoallergiques ou par l'intermédiaire de toxines, les champignons sont de plus en plus mis en cause dans de nombreuses affections pulmonaires d'origine professionnelle (13).

Dans les environnements professionnels fortement contaminés, les concentrations en moisissures sont généralement comprises entre 10^4 et 10^8 spores par m^3 d'air alors que la concentration dans un environnement intérieur sans contamination fongique est généralement en dessous de 10^3 spores par m^3 d'air (OMS 2009).

En milieu agricole, les atteintes respiratoires seraient dominées, en termes de fréquence et de gravité, par les Broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) (76,77). En 1996, la prévalence des BPCO était estimée aux alentours de 10% chez les actifs agricoles en milieu fourrager dans le Doubs (78). Une récente étude a confirmé le rôle des agents biologiques, notamment fongiques dans l'étiologie de cette maladie (13).

D'autres pathologies sont fréquemment rencontrées, comme les pneumopathies d'hypersensibilité. La maladie du poumon de fermier est la plus fréquente des alvéolites allergiques extrinsèques (AAE) observées en milieu rural (79). Bien que reconnues comme des maladies professionnelles, peu d'études de cohorte sur l'incidence des pneumopathies d'hypersensibilité ont été publiées. Chez les agriculteurs en milieu de production laitière, la prévalence en France se situerait entre 0,2 et 1,5% (5). Diverses espèces de moisissures seraient impliquées dans ces pneumopathies dont le nombre d'agents étiologiques potentiels ne cesse de s'accroître (80).

A l'heure actuelle en France, il n'existe pas de valeur limite d'exposition professionnelle pour les bioaérosols fongiques. De plus, la difficulté de standardisation des méthodes de mesures rend difficile l'établissement d'une relation dose/effets de ces agents.

1.4.1.3. L'exposition fongique dans l'habitat et ses conséquences sur la santé

D'après le rapport publié par l'observatoire de la qualité de l'air intérieur en 2006, 37% des logements français pourraient être contaminés par les moisissures. Relativement peu d'études ayant pour objectif le recensement et la quantification fongique dans l'air intérieur et leurs impacts en termes de santé publique ont été menées et il est difficile de corréler de façon rigoureuse la contamination fongique d'un logement et ses effets sur la santé. Certaines méta-analyses ont néanmoins montré une association positive ($OR > 1$) entre la domiciliation dans des logements humides et / ou moisissés et la survenue d'affections respiratoires chroniques (81). Une autre étude a conclu que l'humidité des bâtiments et la présence de moisissures étaient associées significativement à une augmentation de 30 à 50% des pathologies respiratoires (82). Les symptômes les plus couramment associés à une exposition fongique sont des maladies respiratoires et des réactions allergiques. En pédiatrie, la présence de moisissures dans l'habitat augmenterait chez l'enfant le risque d'asthme d'un facteur 1,5 à 3,5 (1,83). Enfin, le syndrome des bâtiments malsains (SDS) est également fréquemment observé et se

caractérise par des cas groupés dans un même bâtiment de symptômes associant des difficultés respiratoires, une fatigue, de la toux, des céphalées, une rhinite, une conjonctivite, voire des nausées (31,83–85).

Outcome	Subject groups	OR (95% CI)		
		Fisk et al. 2007 ^a	Fisk et al. 2010 ^a	Antova et al. 2008 ^b
Upper respiratory tract symptoms	All	1.70 (1.44–2.00)		
Cough	All	1.67 (1.49–1.86)		
	Adults	1.52 (1.18–1.96)		1.30 (1.22–1.39) ^c
	Children	1.75 (1.56–1.96)		1.50 (1.31–1.73) ^d
Wheeze	All	1.50 (1.38–1.64)		
	Adults	1.39 (1.04–1.85)		1.43 (1.36–1.49) ^e
	Children	1.53 (1.39–1.68)		1.49 (1.28–1.74) ^f
Current asthma	All	1.56 (1.30–1.86)		
Ever-diagnosed asthma	All	1.37 (1.23–1.53)		
	Children			1.35 (1.20–1.51)
Asthma development	All	1.34 (0.86–2.10)		
Bronchitis	All		1.45 (1.32–1.59)	
	Children			1.38 (1.28–1.47)
Respiratory infections	All		1.44 (1.31–1.59)	
	Adults		1.49 (1.14–1.95)	
	Children		1.48 (1.33–1.65)	
Respiratory infections ^g	All		1.50 (1.32–1.70)	
Sensitivity to inhaled antigens	Children			1.33 (1.23–1.44)
Hay fever	Children			1.35 (1.18–1.53)

Tableau III: Synthèse de 3 méta-analyses étudiant les effets de l'humidité et des moisissures dans les logements sur la santé humaine (81)

1.4.2. Pathologies associées à une exposition fongique

La plupart des affections fongiques sont causées par l'inhalation de spores. Leur diamètre détermine leur degré de pénétration dans l'arbre respiratoire. Les spores de grand diamètre (10 µm de diamètre) sont déposées dans la partie haute de l'arbre respiratoire, celles plus petites (< 2.5 µm de diamètre), pouvant coloniser les alvéoles (63). L'exposition aux bioaérosols fongiques peut être associée à des effets sanitaires de type toxinique ou allergique, ou être responsable de pathologies infectieuses (8,25,27,29,33,51).

A. fumigatus est l'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine dans les pays tempérés (66% des aspergilloses invasives) (47,54). Les espèces *A. flavus* (14%), *A. niger* (7%) et *A. terreus* (4%) sont également observées. D'autres moisissures peuvent être

responsables de mycoses opportunistes, à l'origine d'infections localisées ou invasives. C'est le cas des zygomycètes ou de certains hyalohyphomycètes, tels que les champignons des genres *Acremonium* sp, *Fusarium* sp, *Scedosporium* sp (1,5,30,36,86).

Outre les facteurs liés à l'hôte, plusieurs éléments propres au champignon contribuent à la survenue et la virulence de ces infections (36,47):

- la petite taille des spores: 2 à 3 μm de diamètre pour *A. fumigatus*, leur donnant la possibilité d'atteindre les alvéoles pulmonaires
- la thermotolérance, permettant leur développement à 37°C (jusqu'à 55°C pour *A. fumigatus*)
- la capacité d'adhérence à la membrane basale et la capacité à induire des microlésions par le biais de toxines nécrosantes
- le tropisme vasculaire (en particulier pour *Aspergillus* sp et l'ordre des Mucorales).

Nom	Effet infectieux	Effet allergisant	Alvéolite	Effet toxique
<i>Acremonium</i>	-	+	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	+	-	-
<i>A. flavus</i>	+	+	-	+
<i>A. fumigatus</i>	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	+	-	-	-
<i>Aspergillus versicolor</i>	-	+	+	+
<i>Chaetomium</i> sp	-	+	-	-
<i>Cladosporium</i> sp	-	+	-	-
<i>Fusarium</i> sp	+	+	+	-
Mucorales: <i>Mucor</i> sp, <i>Absidia</i> sp,	+	+	+	+
<i>Rhizopus</i> sp				
<i>Penicillium</i> sp	-	+	+	-
<i>Stachybotrys</i> sp	-	+	-	+

Tableau IV: Pathogénicité des principales moisissures de l'environnement (1)

1.4.2.1. Réactions allergiques

1.4.2.1.1. Réactions allergiques IgE médiées

La sensibilisation d'un individu aux moisissures est mise en évidence par la présence d'IgE sériques spécifiques. Les principales pathologies rencontrées sont des atteintes bronchiques et de l'asthme, provoquant des difficultés respiratoires et de la toux (1). Les moisissures les plus fréquemment responsables sont *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp et *Aspergillus* sp. Certains auteurs mentionnent également le rôle d'autres champignons, comme *Saccharomyces* sp, *Candida* sp et *Trichophyton* sp (1). La fréquence de la sensibilisation aux moisissures chez le sujet atteint d'allergie respiratoire varie de 2% à 30%. Cette fréquence augmente avec la sévérité de l'asthme et avec le taux de spores atmosphériques (1,5,87,88).

1.4.2.1.2. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA ou maladie de HINSON)

Cette pathologie, survenant sur terrain propice (atopie, asthme, mucoviscidose), associe une réponse immunitaire locale à une colonisation trachéo-bronchique aspergillaire chronique. Deux types d'hypersensibilité sont impliqués: immédiate (avec anticorps réaginique) et semi-retardée (avec anticorps précipitants). Les critères diagnostics associent de l'asthme, des infiltrats pulmonaires, des bronchectasies proximales, des IgE sériques élevées, des tests cutanés positifs et la présence de précipitines (IgG anti-aspergillaires). Ce diagnostic est souvent tardif et l'ABPA évolue vers la chronicité avec des phases de rémission et des phases d'exacerbation (47,89).

1.4.2.1.3. Les alvéolites allergiques extrinsèques (AAE)

Ces alvéolites lymphocytaires sont provoquées par l'inhalation massive et répétée de spores fongiques chez des sujets non atopiques. Les circonstances d'exposition sont essentiellement liées à des risques professionnels (manipulation de foin moisi). Il s'agit d'une affection type « poumon de fermier », mettant en jeu des phénomènes d'hypersensibilité retardée avec des anticorps précipitants (89). Les accès d'AAE durent 24 à 48h et associent toux, dyspnée, fièvre, frissons, râles crépitants et bulleux. La répétition des accès dans les AAE peut conduire à la chronicité avec un tableau d'insuffisance respiratoire chronique par fibrose interstitielle

(1,36,47). *Aspergillus* sp, *Absidia* sp, *Penicillium* sp sont les principaux agents étiologiques d'AAE (1,32).

1.4.2.2. Effets irritatifs et toxiques de constituants ou de métabolites fongiques

1.4.2.2.1. *Organic dust toxic syndrome (ODTS)*

Ce syndrome correspond à une inflammation aigüe des voies respiratoires et des alvéoles et survient après une exposition à une concentration élevée de micromycètes: 10^{10} spores par m^3 d'air. Le travail en zones confinées et la manipulation de grains moisissus constituent un facteur de risque. A la différence des AAE, ce syndrome peut survenir à la première exposition (1,85,90).

1.4.2.2.2. *Pathogénicité des glucanes*

Les β (1-3) glucanes sont des polymères de haut poids moléculaire du glucose, entrant dans la constitution de la paroi fongique. Quelques études rapportent une augmentation de la prévalence des signes respiratoires corrélée à l'augmentation du taux de glucanes chez des personnes exposées (91). Ces composés seraient impliqués dans le processus inflammatoire rencontré dans les ODTS, par stimulation des macrophages et des polynucléaires neutrophiles (1,92).

1.4.2.2.3. *Pathogénicité des mycotoxines*

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires peu volatils, élaborés par diverses moisissures. Il y aurait jusqu'à 400 mycotoxines répertoriées. La taille des particules les contenant ou celles sur lesquelles elles sont adsorbées détermine leur profondeur de pénétration dans l'arbre bronchique. Dans l'environnement intérieur, les espèces *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Chaetomium* sp, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp et *Stachybotrys* sp ont été identifiées comme productrices de nombreuses mycotoxines. La majorité des mycotoxines sont de puissantes cytotoxines qui interfèrent à plusieurs niveaux de la vie cellulaire. Leur mode d'action est varié: agression de l'épithélium pulmonaire, effet immunosuppresseur, effets systémiques (1,84,93)... Le contact avec les mycotoxines peut être

à l'origine d'une toxicité aiguë ou chronique. Les effets délétères sont décrits sur l'appareil respiratoire, les muqueuses nasales et oculaires, la peau, le système immunitaire, le système nerveux central ainsi que sur l'appareil digestif (8).

1.4.2.2.4. Pathogénicité des composés organiques volatils d'origine microbienne (COVm)

Issus principalement du métabolisme primaire des moisissures, ces composés peuvent diffuser au travers des matériaux et sont responsables de l'odeur caractéristique de « moisi » (1,5,6). Les moisissures peuvent émettre des composés organiques de nature très diverse. D'après l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), une exposition prolongée aux COVm entraînerait des symptômes de type irritation des yeux, du nez et de la gorge (94). Les signes cliniques fréquemment rapportés par les sujets exposés sont une rhino-conjonctivite, une irritation de l'oropharynx et de l'arbre bronchique et des démangeaisons. Ces phénomènes irritatifs seraient également en cause dans le syndrome des bâtiments malsains, décrits dans certaines habitations (1,72,85,95–97).

1.4.2.3. Infections fongiques

Le spectre clinique des infections fongiques est large et s'étend des formes localisées, aux atteintes invasives multi-viscérales gravissimes. Ces vingt dernières années, l'incidence globale des infections fongiques profondes a considérablement augmenté en milieu hospitalier (52,55,59,62). Ce phénomène résulte à la fois de l'augmentation du nombre de patients à risque et de l'augmentation de l'intensité du risque (augmentation du nombre de greffes, intensification des chimiothérapies anticancéreuses, nouveaux médicaments...). Les affections fongiques invasives les plus fréquentes sont les candidoses et aspergilloses, avec une incidence très élevée dans les secteurs d'hématologie, de réanimation et de chirurgie (jusqu'à 30%) (52,58,62,98). Les principales moisissures impliquées dans les infections humaines appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Rhizomucor* (36,47).

L'aspergillose invasive représente l'une des pathologies les plus redoutées en secteur hospitalier. En hématologie, l'incidence de ces infections atteint 10% (6 à 24 % chez des patients atteints d'hémapathie maligne et 4 à 9 % dans l'allogreffe de moelle osseuse) et

constitue 30 à 50 % des mycoses invasives. Malgré un traitement prophylactique (par posaconazole principalement), la mortalité de ces infections reste très élevée et varie de 30 à 90%, selon le terrain du patient, l'extension de l'infection et la précocité du traitement (54,55,59,60,72).

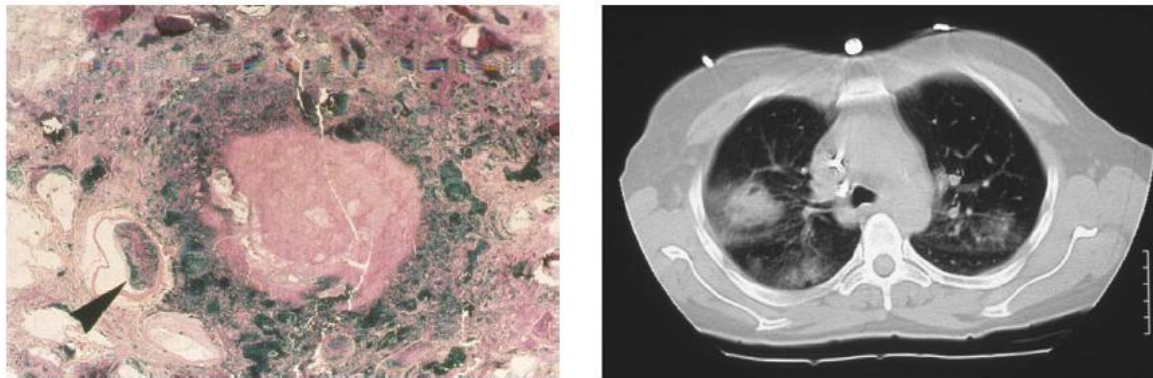


Figure 8: Observations microscopique et tomодensitométrique de lésions pulmonaires associées à une aspergillose invasive. **A gauche: coupe du parenchyme avec présence d'une lésion en cible résultant de l'invasion artériolaire par les filaments mycéliens. A droite : coupe tomодensitométrique avec signe du halo et aspect en verre dépoli entourant une lésion hémorragique (99).**

Certaines formes localisées peuvent également être rencontrées. Le développement fongique au sein d'une cavité pulmonaire, bronchique, voire pleurale préexistante (souvent secondaire à une tuberculose) peut donner un amas de mycélium, ou mycétome. Cette affection, dont la plus fréquente est l'aspergillome ne constitue pas à proprement parler une infection mais plutôt une colonisation. La symptomatologie associe toux, expectorations, fièvre, asthénie, amaigrissement et hémoptysies parfois gravissimes. *A. fumigatus* est l'espèce la plus souvent retrouvée dans ces pathologies (30,36,89,99).

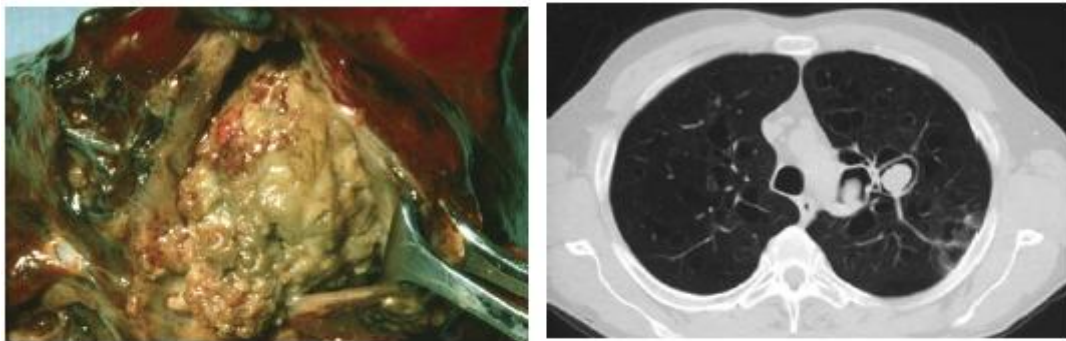


Figure 9: Observations macroscopique et tomodensitométrie de lésions pulmonaires associées à un aspergillome. **A gauche: pièce de lobectomie, truffe aspergillaire extraite d'une cavité séquellaire de tuberculose. A droite: coupe tomodensitométrique avec image en grelot caractéristique (99)**

A l'interface entre les formes localisées et les formes invasives, sont décrites des atteintes chroniques, cavitaires ou nécrosantes. La colonisation fongique de l'arbre respiratoire est fréquemment décrite chez des patients atteints de BPCO mais aussi de mucoviscidose, dont le pouvoir d'épuration broncho pulmonaire est altéré (89). Des spores fongiques peuvent être retrouvées de façon intermittente et en abondance variable dans les sécrétions de ces patients dont la surveillance mycologique est nécessaire (expectorations et sérologies itératives).

2. Méthodes de détection de la biocontamination

Selon le contexte, les techniques de détection ou d'évaluation de la charge fongique peuvent différer. Dans les secteurs protégés hospitaliers, des méthodes très sensibles sont nécessaires, afin de contrôler l'efficacité du système de maîtrise du risque fongique. En revanche, en cas de recherche d'agents étiologiques de maladies professionnelles, des dispositifs capables de mesurer des concentrations élevées en moisissures sont requis et doivent permettre d'établir des valeurs limites d'exposition à ces agents (1,4,7,11,15,16,27,29,35,100). Que ce soit à l'hôpital, dans les logements ou sur les lieux de travail, la mesure de l'exposition aux moisissures nécessite une étape d'échantillonnage puis une étape d'analyse pour caractériser et / ou quantifier la flore fongique et ses composés.

2.1. Méthodes d'échantillonnage

Le principe de ces techniques de collecte est de séparer les particules du flux d'air ou de leur support solide, afin de les recueillir sur des milieux sélectionnés. Les lieux et points de prélèvements doivent être choisis en fonction du risque infectieux supposé le plus élevé pour les patients. Compte tenu des variations d'aérosolisation des spores fongiques évoquées précédemment, l'évaluation de la contamination fongique doit être évaluée simultanément sur des prélèvements d'air et de surfaces.

2.1.1. Méthodes de prélèvements d'air

2.1.1.1. Méthodes par sédimentation

Le recueil par sédimentation consiste à exposer de façon passive un support (boîte de Pétri, milieu de culture, gel...) à la chute naturelle des spores sous l'effet de la gravité. Cette technique ancienne permet une évaluation simple de l'aéro-contamination. Les supports peuvent ainsi être exposés pendant des durées importantes (dans la limite de la dessiccation des milieux de culture et des gels) mais cette méthode présente de nombreux inconvénients: mauvaise reproductibilité, volume d'air exposé non mesurable, biais de sélection par une remise en suspension des spores les plus légères favorisant la sélection des spores les plus lourdes (1,33).

2.1.1.2. Méthodes par impaction

La technique de l'impaction repose sur la séparation des particules d'un fluide porteur (ici l'air), en utilisant leurs propriétés d'inertie. Cette technique est recommandée par la norme 14698-1 sur la maîtrise de la biocontamination en salle propre (71). L'air est aspiré et brusquement accéléré par passage à travers une série d'orifices (grille) et dévié par une surface de collection solide (milieu de culture). Les particules ayant une inertie suffisante sont déviées du flux et sont impactées sur le milieu de culture. Les particules de plus faible inertie sont ré-entraînées dans le flux d'air sortant. Les caractéristiques de l'impaction dépendent des propriétés physico-chimiques des particules (taille et densité), mais également des

caractéristiques de l'impacteur (géométrie, nombre et dimension des orifices, débit d'échantillonnage, trajectoire et vitesse du flux d'air...) (1,25,101).

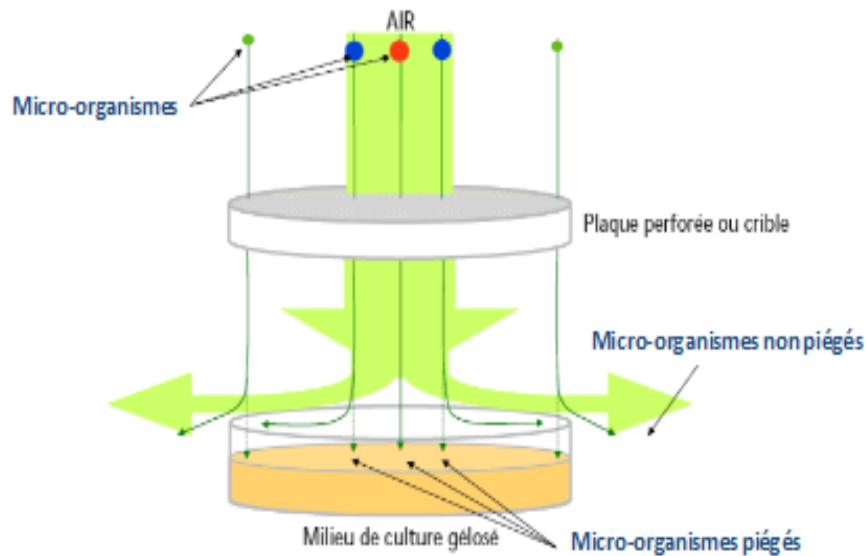


Figure 10: Principe de l'échantillonnage des bioaérosols par la méthode d'impaction (5)

L'impaction peut également être effectuée en milieux liquide (impacteurs en milieux liquides ou impingers): l'air est aspiré au travers d'un tube capillaire, puis propulsé dans une solution. Le liquide de collecte peut ici être dilué ou concentré avant l'analyse (1,25,101). L'efficacité de collecte des appareils varie selon leurs caractéristiques techniques: débit de l'air échantillonné, distance entre la grille et le support de collecte, nombre et diamètre des orifices. Cette technique a une bonne sensibilité et permet de détecter de faibles concentrations fongiques (de l'ordre d'un UFC /m³) (5).

2.1.1.3. Filtration

La technique de filtration consiste à séparer les particules de l'air en le faisant passer à travers un média filtrant (fibres de verres, ester de cellulose, polycarbonates). La collecte des particules peut se faire soit à la surface du média filtrant, soit à l'intérieur du réseau poreux. L'efficacité de collecte est fonction de la porosité et de l'épaisseur du filtre, du diamètre des

particules et de la vitesse du flux d'air (25,101). Ces systèmes permettent des prélèvements de longue durée (8h).

2.1.2. Méthodes de prélèvements des surfaces

2.1.2.1. *Gélose contact*

Le milieu nutritif est contenu dans une boîte de Pétri particulière (boîte contact) et est en forme de léger ménisque, lui permettant d'être en contact avec la surface à prélever. La norme ISO 14698-1 préconise une pression constante et uniforme de 25g/cm² pendant 10 secondes sur l'ensemble de la surface (71,72). Grâce à des applicateurs spécifiques, ces prélèvements peuvent être réalisés de façon standardisée, en termes de durée et de pression appliquée. Cette méthode ne s'applique toutefois que pour des recueils effectués sur des surfaces planes.

2.1.2.2. *Écouvillonnage*

Le prélèvement peut être effectué à l'aide d'un écouvillon stérile humidifié ou non. Cet écouvillon est ensuite déchargé sur une boîte de Pétri. Les méthodes d'écouvillonnage et de détection par gélose contact sont considérées comme équivalentes, en termes de sensibilité et de rendement. Cette méthode permet un recueil sur des surfaces irrégulières (grilles). Néanmoins, la méthode d'écouvillonnage est difficilement standardisable (75,102). L'échantillonnage des surfaces peut permettre de détecter des contaminations fongiques environnementales très faibles, même lorsque les recueils d'air sont négatifs. Néanmoins, le rendement des méthodes traditionnelles (écouvillonnage, gélose contact) est évalué à seulement 30% (40). Afin de mieux évaluer la contamination fongique réelle, d'autres méthodes ont été développées, notamment l'utilisation de lingettes électrostatiques. Cette technique peu onéreuse a montré un rendement supérieur à l'écouvillonnage et à l'utilisation de géloses contacts (40).

2.2. Méthodes de détection et / ou de quantification fongique

Deux grandes approches analytiques de détection de la flore fongique environnementale peuvent être distinguées. Une première stratégie consiste en une évaluation de la contamination globale, par détection et / ou quantification de spores ou de particules fongiques. Une autre démarche vise à détecter ou quantifier des composantes fongiques spécifiques, potentiellement responsables d'effets cliniques.

2.2.1. Détection de spores ou de molécules fongiques

2.2.1.1. Culture mycologique

Les cultures de micro-organismes sont pratiquées depuis plusieurs décennies et constituent l'approche traditionnelle pour détecter, identifier et dénombrer les moisissures. Cette méthode est fréquemment utilisée pour la surveillance fongique de l'environnement hospitalier. Ces milieux contiennent tous des antibiotiques destinés à inhiber le développement de la flore bactérienne. Les milieux les plus fréquemment utilisés sont les suivants:

- Milieu à l'extrait de malt: ce milieu est considéré comme le plus adapté aux prélèvements de l'environnement. Néanmoins, il est facilement envahi par des moisissures à croissance rapide (*Mucor* spp, *Rhizopus* spp), ce qui entraîne une sous évaluation des autres espèces (103,104).
- Milieu rose Bengale: ce milieu inhibe la croissance des espèces à croissance rapide et les colonies, d'assez petite taille, sont plus facilement dénombrables. Néanmoins, sa sensibilité est inférieure à celle du milieu à l'extrait de malt et la pigmentation de certaines colonies rend leur identification plus difficile.
- Milieu dichloran glycérol 18 (DG 18): ce milieu est de plus en plus utilisé et donnerait des résultats comparables ou supérieurs au milieu à l'extrait de malt. Le dichloran limite la taille des colonies, permettant leur dénombrement (103).

- Milieu Sabouraud: classiquement utilisé en diagnostic clinique, ce milieu est peu satisfaisant en étude environnementale (dénombrement et identification difficiles des espèces) (1).

La culture fongique permet de détecter de faibles niveaux de contamination et est utilisée notamment comme méthode de référence dans l'évaluation de la contamination fongique des environnements protégés hospitaliers (35,61,70,100,103,105,106).

Cette méthode présente toutefois quelques limites: le résultat n'est disponible qu'au terme de la période d'incubation, qui peut durer de 24 heures à plusieurs jours selon les champignons. Il est d'ailleurs indispensable d'effectuer plusieurs lectures au cours de cette période. De plus, seule la fraction cultivable de la flore fongique (de l'ordre de 0,1 à 10% selon les auteurs) est mise en évidence (1,106). La fraction viable, non cultivable, mais potentiellement infectante, n'est pas prise en compte. Enfin, dans le cas de la technique d'échantillonnage par impaction, une seule colonie peut être observable, alors que plusieurs spores peuvent avoir été déposées au même endroit sur la gélose (25).

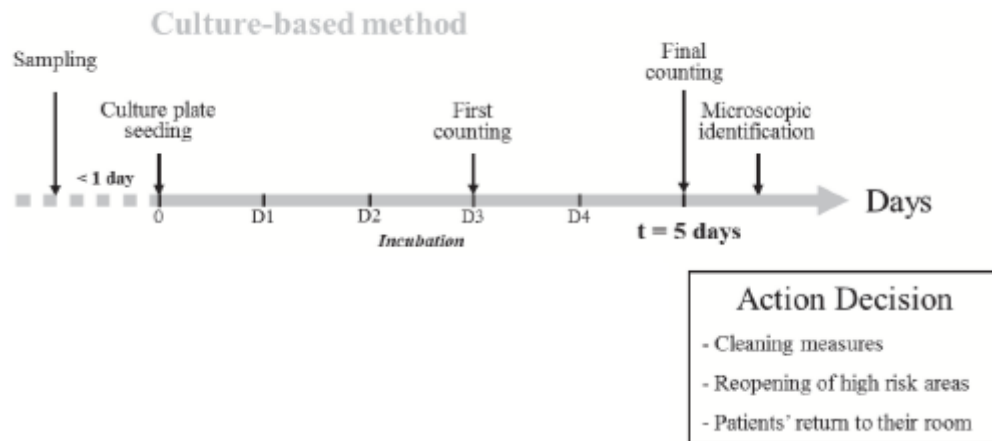


Figure 11: Etapes de la culture fongique (5)

2.2.1.2. Détection par cytométrie

Des techniques de cytométrie ont été développées afin de détecter la contamination fongique de l'environnement. Ces méthodes, en associant un marqueur fluorescent et une détection par

un faisceau laser, permettent de détecter en quelques heures des champignons, mais également des bactéries, difficilement cultivables sur les milieux traditionnels (5,107–109).

En cytométrie de flux, les particules sont entraînées à grande vitesse par un fluide dans un tube capillaire et traversent le faisceau d'un laser. Un système de détection de la lumière réémise par fluorescence permet la caractérisation et le dénombrement des particules.

Les analyseurs Bactiflow et Dcount (bioMérieux) permettent un dénombrement rapide (30 minutes) des contaminants biologiques. Ces analyseurs sont fréquemment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire mais leur application dans le contrôle environnemental est encore limitée (110).

Une autre approche proposée est la cytométrie à balayage (ou cytométrie en phase solide) : Après filtration d'un échantillon (prélèvement d'air, de surfaces ou échantillon biologique) sur une membrane spécifique, les micro-organismes présents sont marqués par un fluorochrome, détectés par cytométrie à balayage laser et discriminés par un logiciel (5). L'analyseur ScanRDI (bioMérieux) est utilisé notamment par l'industrie pharmaceutique pour le contrôle de la stérilité de certains produits (médicaments injectables), avec des performances supérieures aux méthodes classiques (évaluation réalisée sur des souches d'*A. niger* et de *C. albicans*) (5,107–109).

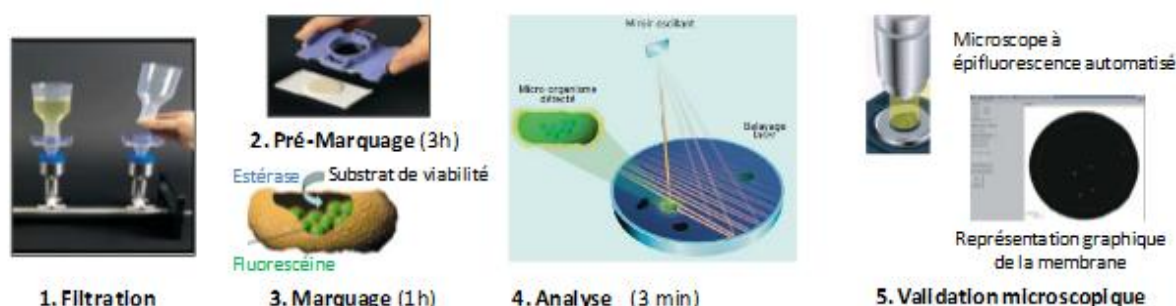


Figure 12: Protocole de quantification de la flore fongique viable par cytométrie en phase solide (5)

La cytométrie de flux, combinée à une technique d'hybridation fluorescente (technique FISH) a été utilisée pour détecter des particules fongiques environnementales (111). Cette technique manque toutefois de spécificité et il n'est pas toujours facile de distinguer les spores fongiques des particules inertes. L'utilisation de cette méthode est limitée par le manque

d'immunomarqueurs disponibles pour avoir une représentation exhaustive de la flore fongique environnementale. De plus, un investissement matériel initial conséquent (200 000 \$ pour acquérir l'analyseur) rend cette technique peu adaptée à l'évaluation courante de la flore fongique. Des détections plus performantes en cytométrie de flux sont obtenues par le développement d'anticorps fluorescents spécifiques. Cette approche a notamment été proposée par Vanhee *et al.* pour la quantification d'*A. fumigatus* dans des prélèvements d'air (105).

2.2.1.3. *Biologie moléculaire*

2.2.1.3.1. La PCR

Le développement de la PCR constitue une avancée majeure dans le domaine de la détection et de l'identification des micro-organismes en général et des champignons en particulier. Leur bonne sensibilité, spécificité et leur temps d'analyse réduit rend ces techniques tout à fait appropriées pour des applications dans la surveillance de la biocontamination environnementale (26,28,112,113). Les performances varient selon les méthodes utilisées. Actuellement, les méthodes de PCR les plus performantes, PCR par hybridation de sondes et PCR nichée, ont un seuil de sensibilité d'une spore par réaction (41,114–116). Ce seuil très bas correspond aux critères de performances exigés dans les environnements à faible contamination.

Comme évoqué précédemment, seule une fraction de la flore fongique totale est mise en évidence par la culture. Cette sous estimation de la charge fongique par la culture est constatée dans de nombreuses études (41,116). Appliquée aux prélèvements environnementaux, la PCR permet la mise en évidence d'espèces viables mais non ou difficilement cultivables (VBNC) (*Leptosphaerulina* sp, *Phaeococcomyces* sp, *Malassezia* spp,...) (6,117).

Cette technique permet également de s'affranchir de certaines contraintes liées à la culture fongique (délai d'analyse, sélectivité du milieu, sensibilité...). De nombreuses études ont été réalisées à ce jour et des systèmes d'amorces et de sondes spécifiques ont été développées pour évaluer la détection des principales moisissures environnementales par PCR notamment *Cladosporium* sp et *A. fumigatus* (28,41,118,119). Deux types de techniques peuvent être utilisées: une PCR Panfongi, qui permet une évaluation globale de la contamination fongique

ou une PCR ciblée sur une moisissure en particulier: *Aspergillus* sp, *A. fumigatus*, *A. versicolor*, *Cladosporium* sp, *A. alternata* (39,41,114,117,118,120–124).

L'usage d'une PCR en temps réel sur plus de 100 espèces de moisissures a permis à l'US Environmental Protection Agency (USEPA) de développer un système de score pour caractériser la contamination d'un logement: le score ERMI (Environmental Relative Moldiness Index) (125,126). Cet indice est utilisé en épidémiologie, notamment pour chiffrer la contamination de l'habitat chez les enfants asthmatiques (126).

L'utilisation de la PCR ouvre des perspectives prometteuses en mycologie environnementale; néanmoins la plupart des méthodes développées jusqu'à présent consistent en la détection de fragments d'ADN fongiques qui peuvent subsister longtemps après la destruction de la cellule. En ne différenciant pas les particules fongiques viables et non viables, les techniques PCR pourraient donc surestimer le risque fongique « réel » (53,117,123,127).

2.2.1.3.2. Les méthodes de séquençage moléculaire

Le développement des techniques de séquençage des acides nucléiques a permis l'apparition de nouvelles méthodes de détection fongique, rapides et sensibles. Parmi ces techniques de séquençage « nouvelle génération », le pyroséquençage permet la détection et l'amplification de plusieurs milliers de paires de bases en quelques heures. Cette technologie ouvre des perspectives prometteuses dans le domaine de l'évaluation de la biocontamination fongique, en permettant le séquençage en une dizaine d'heures de fragments de nucléotides et en les comparant à une base de données (128–131). Néanmoins, sur les 1.5 millions d'espèces fongiques estimées dans l'environnement, seulement 5% ont été décrites, et 1% séquencées (129). Afin de permettre une évaluation exhaustive de la contamination fongique, cette méthode nécessite des « banques de génomes » fongiques plus complètes. A notre connaissance, cette technique n'a pas encore fait l'objet d'application dans le domaine environnemental.

2.2.2. Détection de constituants fongiques spécifiques

Ces techniques permettent une évaluation rapide de la charge fongique d'un environnement, mais leur sensibilité généralement assez faible les rend peu adaptées à l'utilisation en zone

faiblement contaminée et en secteur protégé. En revanche, ces techniques présentent un intérêt en terme de santé publique, en détectant des agents étiologiques spécifiques (maladie professionnelle, allergie...) ou en évaluant une charge fongique globale dans un environnement exposé aux moisissures (1,3–6,16,17,27,29,51,125,132).

2.2.2.1. Détection de COVm

Ces composés peuvent être prélevés sur des tubes adsorbants (contenant généralement du charbon activé) par des techniques de prélèvements actifs ou passifs. Après extraction, les COVm sont détectés par chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse, ou par ionisation de flamme (2,95,96,133). La détection de COVm, même en l'absence de moisissure apparente, permet d'évoquer une contamination fongique. Néanmoins, leur mise en évidence ne permet pas l'identification d'espèce et est dépendante de l'environnement (matériaux de construction, peintures, mobilier...) (2).

2.2.2.2. Dosage de l'ergostérol

L'ergostérol est un stéroïde constitutif de la membrane des cellules fongiques. Son dosage représenterait une bonne évaluation de la charge fongique totale (1,3,134). Après recueil sur filtre, la quantification d'ergostérol peut être effectuée par chromatographie phase liquide (HPLC) couplée à une spectrométrie de masse (135). Cette méthode est rapide et spécifique d'une contamination fongique mais ne permet pas l'identification de l'espèce. La limite de détection de cette technique a néanmoins été évaluée à 150 spores par m³, excluant son utilisation dans les zones à faible contamination (1,97).

2.2.2.3. Détection de mycotoxines

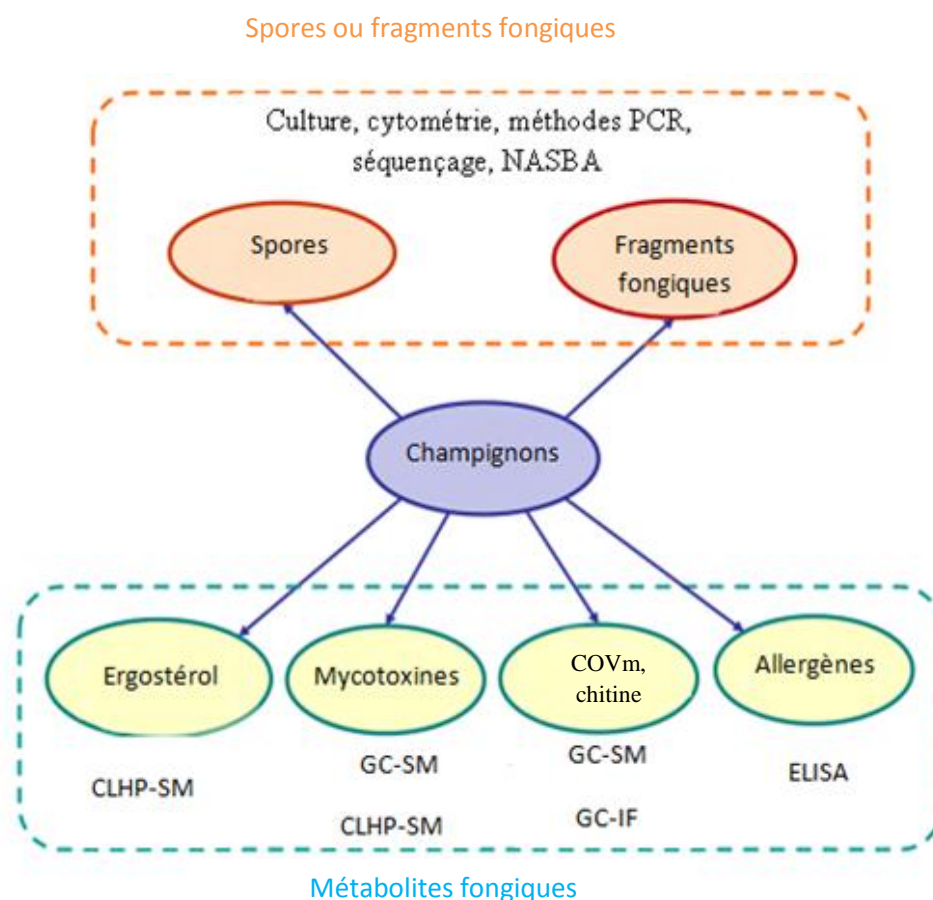
Le dosage des mycotoxines dans l'air est encore peu répandu. Certaines molécules peuvent être dosées par un couplage HPLC / spectrométrie de masse (85). Toutes les souches d'une même espèce ne sont pas forcément productrices de mycotoxines (136). De plus, cette sécrétion est modulée notamment par les paramètres physico-chimiques de l'environnement: température, humidité, nature du substrat sur lequel les mycotoxines se sont adsorbées (poussière, spores) (10,136).

2.2.2.4. Dosage de la chitine

Constituant de la paroi des micromycètes, la chitine peut être dosée par spectroscopie UV ou chromatographie phase gazeuse. Les résultats sont obtenus en 5-6 heures. Toutefois, cette méthode est assez peu reproductible: la teneur en chitine varie selon les espèces et l'âge de la souche. De plus, cette technique détecte indifféremment le mycélium vivant ou mort (134).

2.2.2.5. Recherche d'allergènes

Les allergènes sont des antigènes pouvant causer une réaction allergique. Les méthodes d'immunoanalyse, ainsi que le développement d'anticorps monoclonaux, permettent de détecter certains allergènes avec une grande spécificité. Cette technologie présente un intérêt clinique dans la recherche d'agents étiologiques d'une maladie professionnelle (137,138). Néanmoins, la sensibilité de cette technique semble médiocre dans les environnements à charge fongique faible (58).



GC: Chromatographie en phase gazeuse, CLHP: Chromatographie en phase liquide, SM: Spectrométrie de masse, IF: Ionisation de Flamme

Figure 13 : Méthodes de détection de la flore fongique environnementale

3. La technique NASBA

La NASBA, ou Nucleic Acid Sequence Based Amplification est une technique conçue pour détecter et amplifier des acides nucléiques (fragments d'ARN ou d'ADN), développée par J. Compton en 1991 (24). Il s'agit d'une technique isotherme (41°C), contrairement à l'amplification par PCR, et qui nécessite trois enzymes:

- Une AMV-RT (Avian Myeloblastosis Retrotranscriptase), qui catalyse la polymérisation d'ADN à partir d'une matrice d'ARN ou d'ADN
- Une RNase H, endonucléase qui dégrade le brin d'ARN des molécules hybrides ADN / ARN
- Une ARN T7 polymérase: polymérase issue du bactériophage T7, qui catalyse la synthèse d'ARN dans le sens (5'→3') par transcription d'une molécule d'ADN bicaténaire.

A partir d'un acide nucléique cible, cette technique permet la synthèse de nombreux ARN, même en présence d'ADN (24,139,140).

3.1. Etapes de la technique NASBA

3.1.1. Extraction des acides nucléiques (141)

Préalablement à cette étape d'amplification, il est nécessaire d'extraire et d'isoler les acides nucléiques de l'échantillon étudié. Fréquemment utilisée, la technique décrite par Boom est basée sur les propriétés magnétiques de la silice et ses capacités à fixer des acides nucléiques en présence d'un agent chaotrope: un sel de guanidine (142). Les propriétés dénaturantes de l'isothiocyanate de guanidine à haute concentration permettent la destruction des cellules de l'échantillon et le relargage des acides nucléiques. Ce composé inhibe également l'activité d'agents interférants, comme des DNases ou RNases. Les acides nucléiques libérés se lient ensuite à une silice micronisée. Après lavage de la solution, une alcalinisation du milieu par un tampon boraté (pH>8) permet ensuite de décrocher les acides nucléiques de la silice.

3.1.2. Principe de la NASBA

L'amplification NASBA se décompose en deux étapes :

- Une étape linéaire (24,141,143–145):

Une amorce (primer 1), contenant à l'extrémité 5' la séquence promotrice de l'ARN polymérase, s'hybride avec l'ARN cible grâce à son extrémité 3' complémentaire. La transcriptase inverse copie l'acide nucléique à partir de l'extrémité 3' de l'amorce: une molécule bicaténaire hybride ADN / ARN est formée. Le brin d'ARN est ensuite dégradé par la ribonucléase H, puis une seconde amorce (primer 2) s'hybride sur le brin d'ADN restant (étape 2). Seules les molécules d'ARN des hybrides ADN / ARN sont dégradées par la RNase, qui n'a pas d'action sur les ARN simples brins. La seconde amorce est alors étendue par l'AMV-RT pour former un ADN intermédiaire à 2 brins, contenant le promoteur de la polymérase d'ARN T7 nécessaire pour la transcription (étape 3) et apporté par l'amorce 1. Lors de cette première phase, l'amplification du signal nucléotidique suit un modèle linéaire: la quantité d'ADN double brin formé est directement proportionnelle au taux d'ARN cible de départ.

- Une étape d'amplification exponentielle (141,143,145):

L'ARN T7 polymérase permet la transcription de cet ADN en un grand nombre de copies d'ARN (étape 4). L'ARN formé est un ARN antisens, (complémentaire de l'ARN cible initial). Cet ARN est ensuite utilisé comme matrice dans un nouveau cycle d'amplification. L'amorce 2 s'hybride à l'ARN puis l'action de l'AMV-RT et de la RNase permet la formation d'un ADN complémentaire simple brin. L'amorce 1 et l'AMV-RT permettent ensuite la formation d'un ADN double brin, contenant également la région promotrice de l'ARN T7 polymérase. De nombreuses copies d'ARN antisens sont ainsi produites à partir de cet ADN (action de la T7 polymérase) et initieront un nouveau cycle d'amplification.

Les amplicons produits sont complémentaires de l'ARN cible (ARN antisens). La technique NASBA Panfungi développée par la société BioMérieux permet de générer en 60 à 90 minutes environ 10^9 copies d'un ARN de départ (145).

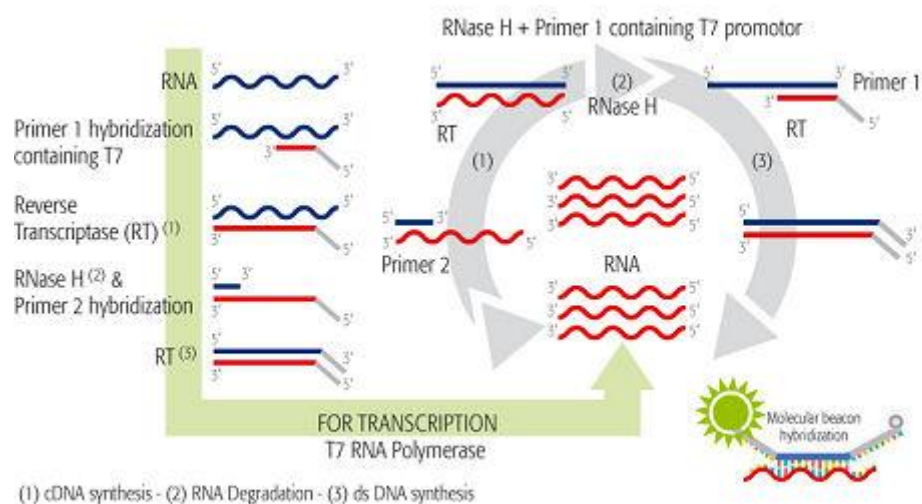


Figure 14: Principe de l'amplification NASBA (145)

3.1.3. Initiation de l'amplification et choix des amorces P1 et P2 (141)

L'amorce P1 est constituée: du promoteur de la T7 en 5', indispensable pour l'initiation de la transcription, et d'une zone d'hybridation en 3', de 20 à 30 nucléotides complémentaires de la séquence cible. L'amorce P2 contient en 5' une zone identique à la séquence cible. Une séquence additionnelle peut être ajoutée en 3' pour faciliter la détection en électrochimiluminescence.

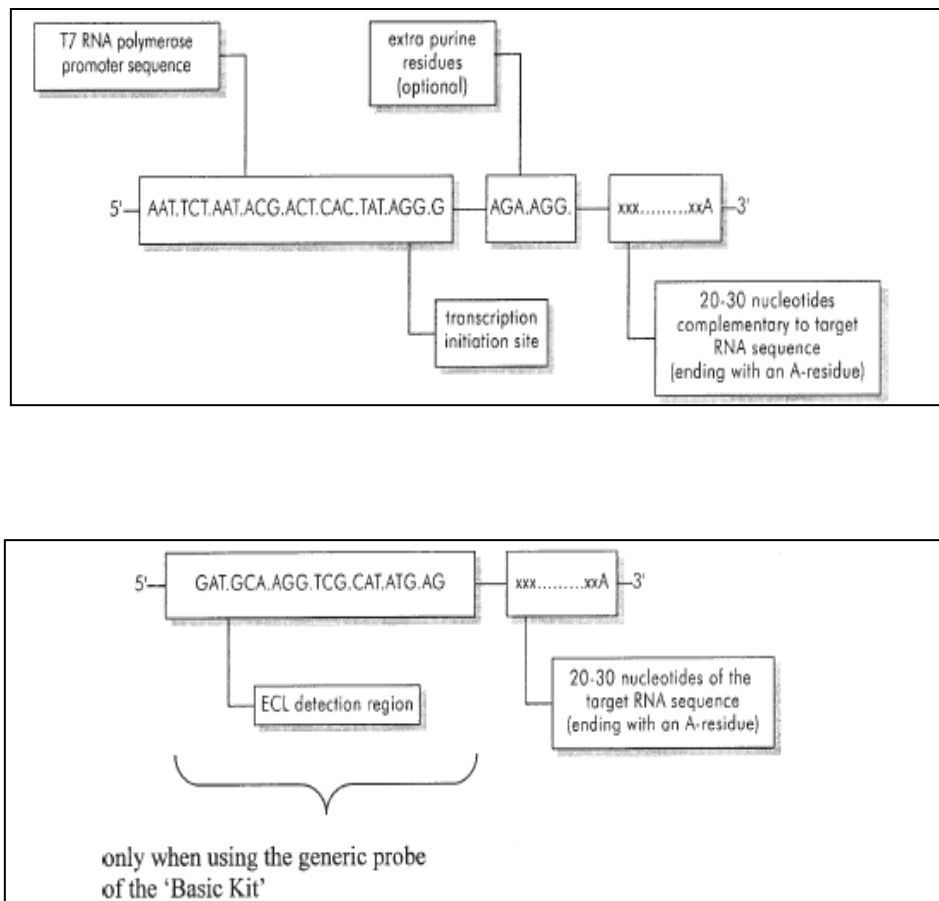


Figure 15: Caractéristiques du couple d'amorces P1 (en haut) et P2 (en bas) idéal (141)

3.1.4. Détection du signal fluorescent et principe des molecular beacons

Plusieurs systèmes de détection, tels que les agents intercalants ou les sondes d'hybridation ont été utilisés pour la détection ou la quantification du signal d'amplification en biologie moléculaire (141,146–148). La NASBA Panfungi mise au point par bioMérieux utilise une technique récente d'hybridation de sondes nucléotidiques: les balises moléculaires ou molecular beacons. Ces sondes d'hybridation comportent une séquence en épingle à cheveux (complémentaire de la cible) et deux fluorochromes: un émetteur (reporter) à l'extrémité 5' et un répresseur (quencher) à l'extrémité 3'. La conformation tridimensionnelle de la sonde à l'état non liée (le reporter et le quencher se trouvent très près l'un de l'autre) inhibe l'émission de fluorescence. En revanche, lors de l'étape d'hybridation la sonde se lie à sa séquence complémentaire. L'éloignement spatial supprime alors l'action inhibitrice du quencher et entraîne l'émission de fluorescence par le reporter.

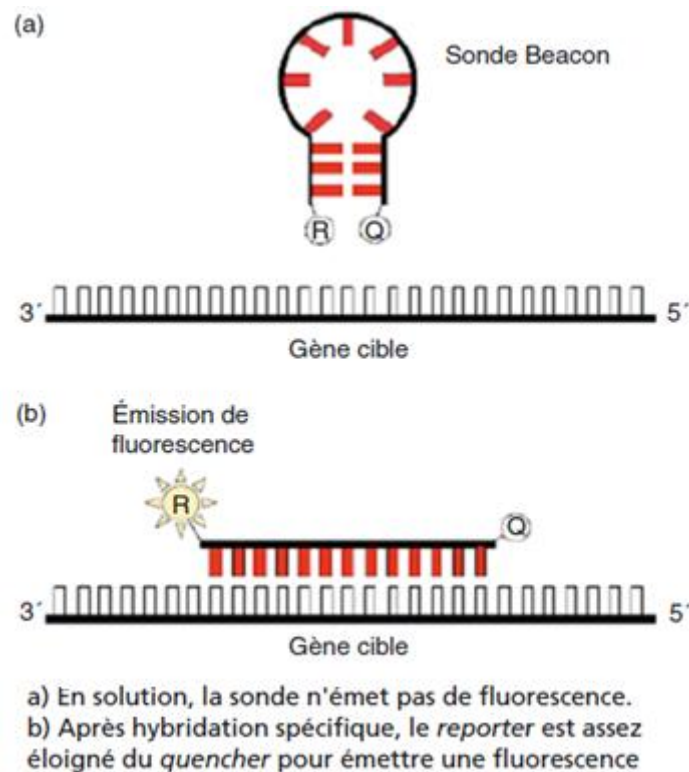


Figure 16: Principe d'une sonde molecular beacon (149)

La detection par molecular beacons présente de nombreux avantages:

- les sondes restent intactes après hybridation et peuvent se réhybrider dans un nouveau cycle
- ces sondes possèdent une grande spécificité d'hybridation et peuvent détecter des variations de l'ordre d'un nucléotide. Elles sont donc utilisables pour la détection et le criblage à grande échelle des Single Nucleotid Polymorphism (SNP)
- l'intensité de fluorescence émise est mesurée en temps réel et est directement proportionnelle à la concentration de la cible
- différents fluorophores, avec des longueurs d'ondes spécifiques d'émission de fluorescence peuvent être utilisés, permettant des analyses en multiplex (150).

Depuis leur mise au point en 1996, l'utilisation des balises moléculaires s'est considérablement accrue dans le domaine du diagnostic clinique et environnemental et de nombreuses techniques NASBA utilisant une détection par molecular beacon ont été développées (148,151–156).

3.1.5. Validation de l'amplification et choix du contrôle interne

Avant de valider le résultat d'amplification et de conclure sur la présence ou l'absence de l'ARN cible dans l'extrait analysé, il est nécessaire de contrôler que l'amplification s'est effectuée correctement par l'ajout d'un contrôle interne. Celui utilisé par la NASBA Panfungi est une séquence d'ARN proche de la séquence d'ARN cible et est amplifié simultanément. Ces deux séquences nucléotidiques utilisent les mêmes amorces mais possèdent un site d'hybridation spécifique pour des balises moléculaires différentes. Deux signaux d'émission de fluorescence doivent être distingués lors de l'amplification: celui du contrôle interne (6 ROX) et celui de l'amplicon cible (6 FAM). L'utilisation d'un contrôle interne permet d'exclure des résultats faussement négatifs notamment par la présence d'un inhibiteur d'amplification contaminant le milieu réactionnel (157).

3.1.6. Principaux paramètres de la courbe de fluorescence

Initialement, la concentration en amorce est très supérieure à celle des ARN cibles. Le temps de déplétion des amorces, nommé alpha 3 correspond à l'instant où le milieu réactionnel est épuisé en amorces et où le taux d'ADNc atteint son maximum. Les ARN deviennent alors la cible des molecular beacons. En effet, la cinétique d'hybridation des amorces étant prioritaire à celle des balises moléculaires, le point d'abscisse alpha 3 marque le début de l'augmentation de la fluorescence. Le contrôle interne de la NASBA Panfungi et l'ARN cible utilisant les mêmes amorces, leurs temps alpha 3 sont théoriquement identiques.

Un plateau est observé sur la courbe de fluorescence après 90 minutes, correspondant à la déplétion en nucléotides dans le milieu réactionnel. Le MSR (Maximal Signal Ratio) correspond au maximum de fluorescence émis lors de l'amplification. La quantité de balises moléculaires étant inférieure au nombre d'amplicons générés par la réaction, ce seuil est atteint lorsque toutes les balises moléculaires sont hybridées. (Il existe une corrélation directe entre la valeur du MSR et la quantité de balises moléculaires). Le système automatisé NucliSENS EasyQ[®], développé par bioMérieux, permet l'amplification NASBA et l'analyse du signal fluorescent en temps réel.

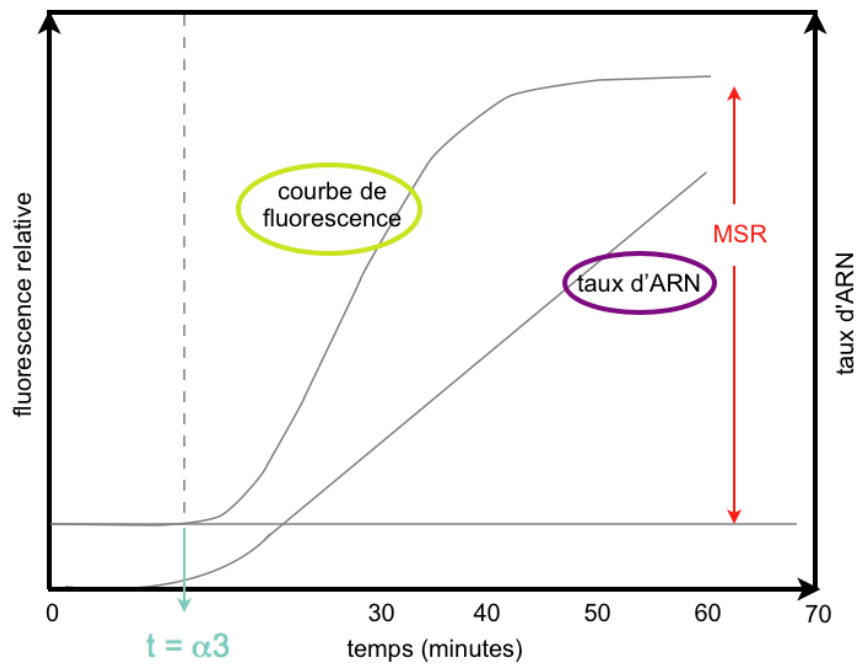


Figure 17: Modélisation d'une courbe de fluorescence NASBA et représentation théorique du taux d'ARN correspondant (148)

3.2. Applications de la NASBA

3.2.1. Détection d'agents infectieux

La NASBA possède de nombreuses applications dans le domaine du diagnostic médical et différentes méthodes de détection et d'amplification de micro-organismes sont actuellement commercialisées, notamment en bactériologie et en virologie. Plusieurs matrices humaines peuvent être utilisées: sang total, sérum, plasma, urine, broncho-aspiration, LCR, biopsie de peau, salive (158–167). L'une des premières applications de la technologie NASBA dans l'aide au diagnostic et suivi en pathologie humaine concerne la détection de virus et la quantification de charges virales sanguines.

3.2.1.1. Détection et quantification de charges virales

Dans le cadre du suivi des patients atteints du VIH 1, la méthode NASBA NucliSENS EasyQ[®] HIV-1 v1.1 a une spécificité comparable (99.4 %) et une sensibilité et sélectivité supérieures aux techniques PCR *Versant HIV-1 RNA* (Bayer[®]) et *Cobas Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5* (Roche Diagnostic Systems[®]) (161). Une quantification par NASBA est également utilisée dans le cadre du suivi de la charge virale des patients atteints du VHC. Dans ce cas, la sensibilité de la méthode NASBA a été évaluée 10 fois supérieure à celle de la PCR *Quantiplex HCV-RNA* (Bayer[®]) et comparable à la technique *HCV Monitor PCR based assay* (Roche[®]) (168). Des méthodes NASBA ont aussi été développées dans le diagnostic des infections aux Flavivirus: une approche basée sur la détection de gènes d'enveloppe du West Nile virus a montré une sensibilité 1000 fois supérieure à celle de la rt-PCR standard et équivalente à la PCR Taqman (Roche[®]) (169,170). Enfin, dans le cadre du diagnostic des infections à Cytomégalo virus, Zhang *et al.* ont proposé une amplification et une détection spécifique par NASBA de l'ARNm pp67. Cet ARN, codant pour la protéine virale pp65 constitue un marqueur précoce de réplication virale. Dans le suivi des patients immunodéprimés, sa détection permettrait une prise en charge rapide de l'infection (165).

3.2.1.2. Diagnostic d'infections bactériennes

Des méthodes NASBA sont également utilisées dans la recherche d'infections ou de colonisations bactériennes. L'utilisation du mix réactionnel *Nuclisens Basic kit* de bioMérieux, associé à des amorces et des sondes spécifiques, permet, par détection d'ARN 16S, une détection en multiplex des infections à *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis* avec une excellente sensibilité: respectivement de 97,4% et 100% (171).

3.2.1.3. Diagnostic d'infections fongiques

Des méthodes d'amplification moléculaire ont été développées afin de pallier au manque de spécificité, de sensibilité et de rapidité des techniques diagnostiques habituelles (hémocultures, sérologies aspergillaires...).

3.2.1.3.1. Diagnostic des candidémies

Plusieurs auteurs ont comparé les performances de la NASBA dans la détection des candidémies à celles des méthodes d'hémocultures. Dans une étude effectuée sur des échantillons de patients présentant une candidémie, 34% des prélèvements ont été détectés positifs en NASBA, contre 21% par le système d'hémoculture BacT/ALERT® (172). Dans une autre étude, les sensibilités de la NASBA Panfungi et d'une NASBA Pancandida ont été évaluées de l'ordre de 1 à 10 UFC /ml de sang (1,8 UFC /ml de sang pour *C. albicans*, soit 10^3 - 10^4 copies d'ARN 28S) (153). Cette technique permet également de raccourcir le délai de diagnostic (de 30 minutes à 3 heures, contre plusieurs jours d'incubation des flacons d'hémoculture) et ainsi une prise en charge plus rapide du patient (172,173).

3.2.1.3.2. Diagnostic des aspergilloses invasives

Des travaux réalisés sur des échantillons de sang de patients à risque d'aspergillose invasive ont évalué la limite de détection d'une méthode NASBA Aspergillus à 1 UFC /ml de sang total (174). Cette très bonne sensibilité, équivalente à celle obtenue par les techniques de PCR nichée, permettrait une détection rapide (3 heures) des aspergilloses invasives (153). Ces résultats sont confirmés par les études de Zhao *et al.*, qui ont obtenu une sensibilité similaire en évaluant la NASBA Panfungi et une NASBA Panaspergillus, également sur des prélèvements sanguins (limite de détection évaluée à 10^3 copies d'ARN 28S pour *A. fumigatus*) (153). Par ailleurs, une autre étude a montré la bonne sensibilité analytique de la NASBA sur des spores d'*A. fumigatus* détectés dans des broyats de tissus pulmonaires et des liquides de lavages broncho-alvéolaires chez des rats atteints d'aspergillose invasive (175).

Analyte	Target
<i>Campylobacter jejuni</i>	16S rRNA
<i>Candida spp.</i>	18S rRNA
CD14	mRNA
Chemokine MIP1-alpha	mRNA
Chemokine MIP1-beta	mRNA
Chemokine RANTES	mRNA
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	OmpA mRNA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	16S rRNA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	16S rRNA
<i>Cryptosporidium parvum</i>	mRNA
Cytokeratin-19	mRNA
Cytomegalovirus (CMV)	pp67 mRNA
CMV	IE 1 mRNA
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	eae-gene
Epstein-Barr virus (EBV)	EBNA1 RNA
EBV	LMP1 RNA
EBV	LMP2 RNA
EBV	BARF1 RNA
EBV	EBER1 RNA
Factor V Leiden	mRNA
Hepatitis C virus	5'NCR
Human Bcr-Abl oncoprotein	mRNA
Human CCR5 chemokine receptor	mRNA
Human Herpes virus (HHV)-6	U87 IE mRNA
HHV-6	U87 mRNA P41
HHV-6	U86 mRNA
HHV-8	T0.7 mRNA
Human Immunodeficiency virus (HIV)-1	Gag RNA
HIV-1	LTR RNA
HIV-1	spliced mRNA
Human Macrophage derived chemokine	mRNA
Human Papillomavirus type 16	E6-E7 mRNA
Human Rhinovirus	5'NTR
Human T-cell leukemia virus (HTLV)-1	Pol-1 RNA
HTLV-1	tax-A RNA
HTLV-1	tax-B RNA
Human Tissue Factor	mRNA
Human TNF-alpha	mRNA
Interferon (IFN)-beta	mRNA
<i>Listeria monocytogenes</i>	16S rRNA
Measles virus	mRNA
<i>Mycobacterium leprae</i>	16S rRNA
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	16S rRNA
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16S rRNA
<i>Mycobacteria species</i>	16S rRNA
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16S rRNA
<i>Plasmodium</i> parasites	ss rRNA
Potato Leafroll virus	Coat protein mRNA
Simian Immunodeficiency virus (SIV)	Viral RNA
Varicella-zoster virus (VZV)	ORF63 mRNA
VZV	ORF68 mRNA

Tableau V: Exemples d'agents infectieux détectés par des méthodes NASBA et cibles moléculaires associées (141)

3.2.2. Etude de viabilité des micro-organismes

La corrélation entre présence d'ADN et viabilité cellulaire s'est avérée souvent faible et des fragments d'ADN peuvent persister longtemps après la mort cellulaire (176–179). A l'inverse, les molécules d'ARNm sont dégradées rapidement et leur détection par NASBA semble constituer un bon indicateur de la viabilité cellulaire et en conséquence de la contamination microbiologique d'un milieu (179–181). Cette hypothèse est corroborée par des études comparatives de détection de l'ARNm 16S par NASBA et de l'ADN 16S par PCR réalisées

sur des souches de mycobactéries et des souches de *C. trachomatis*. Après une exposition à un antibiotique, le taux d'ARNm détecté par NASBA diminue fortement, alors que le taux d'ADN reste stable (162,182). Dans une étude similaire portant sur des souches d'*E. coli* tuées par la chaleur, les taux d'ARNm 16S (évalués par NASBA et rt-PCR) ont été confrontés à ceux d'ADN 16S (évalués par PCR) (179,183). La comparaison des signaux obtenus par biologie moléculaire aux résultats des cultures bactériennes (permettant de dater précisément la mort cellulaire) a montré que la NASBA permettait un meilleur suivi de la décroissance bactérienne. En conséquence, la NASBA apparaît donc comme une méthode prometteuse pour évaluer la présence de micro-organismes vivants dans un environnement.

3.2.3. Détection d'agents non infectieux

Dans de nombreux autres domaines que l'inféctiologie, des méthodes utilisant la technologie NASBA ont été développées et constituent une aide au diagnostic médical: détection de l'ARNm du transcrit de fusion BCR-ABL du chromosome Ph⁺ (LMC), détection du facteur V Leiden, détection des gènes d'expression des chimiokines, des cytokines, du TNF alpha et de cellules tumorales circulantes (164,184–188).

3.3. Evaluation de la NASBA Panfungi de bioMérieux

En collaboration avec le centre Christophe Mérieux (bioMérieux), des études réalisées en 2009 et 2010 au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble ont évalué les performances de la NASBA Panfungi sur des isolats fongiques d'origine environnementale ou clinique. Des suspensions calibrées de spores (provenant de 6 isolats de moisissures) ont permis d'estimer le seuil de détection analytique à 0,5 spores par NASBA (189). La spécificité analytique a été établie à partir de 100 isolats fongiques (53 issus de 8 genres de moisissures et 47 issus de 11 genres de levures) et 6 isolats bactériens (*Escherichia. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes* et *Legionella pneumophila*) (190). A la concentration de 1 McF, tous les extraits fongiques ont été détectés par la NASBA Panfungi et aucun signal n'a été observé avec les extraits bactériens.

Ces excellentes performances sont confortées par les travaux d'autres auteurs. Dans une étude portant sur des isolats des genres *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* et *Saccharomyces*, Zhao et *al.* ont évalué la spécificité analytique de la NASBA Panfungi à 100% et la sensibilité analytique à 0,14 CFU d'*A. fumigatus* et 1.8 CFU de *C. albicans* (140,153).

Ces résultats tendent à confirmer le grand potentiel de la NASBA Panfungi. En effet, ses caractéristiques techniques (détection de souches fongiques viables mais potentiellement non cultivables) et ses capacités analytiques (rapidité, sensibilité, spécificité) en font une technologie très intéressante dans l'évaluation de la contamination fongique environnementale. Néanmoins, les performances présentées jusqu'à présent ont été établies essentiellement à partir de souches fongiques fréquemment pathogènes et une évaluation de cette technique sur des prélèvements environnementaux demeurerait nécessaire.

Objectifs de l'étude

La maîtrise de l'aéro-biocontamination est un enjeu majeur dans de nombreux domaines en particulier hospitalier, industriel ou agro-alimentaire. Le secteur aérospatial doit également répondre à ces exigences. Le projet MiDASS, développé par la société bioMérieux pour l'Agence Spatiale Européenne, a pour ambition la mise au point d'une plateforme automatisée d'évaluation rapide de la contamination fongique et bactérienne d'un environnement. Dans cette optique a notamment été conçue une méthode de biologie moléculaire de détection et d'amplification de l'ARNr 28S commun à l'ensemble du règne fongique, la NASBA Panfungi. Une collaboration entre la société bioMérieux et le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble a permis d'étudier la sensibilité et la spécificité « *in vitro* » de la NASBA Panfungi sur les souches de moisissures et de levures les plus fréquentes. Il restait néanmoins nécessaire d'évaluer l'application de cette technologie « *in vivo* » sur des prélèvements environnementaux.

Un des objectifs du projet MiDASS est de détecter avec une très grande sensibilité des spores fongiques dans un milieu où la contamination est quasi-nulle (proche de l'environnement des stations spatiales). Les performances de la NASBA Panfungi ont donc été évaluées dans un secteur microbiologiquement maîtrisé, théoriquement exempt de micro-organismes viables: les chambres d'isolement protecteur des patients d'hématologie en secteur hospitalier. La contamination fongique de l'environnement a été estimée à la fois par des prélèvements d'air et des prélèvements de surfaces. De plus, des prélèvements complémentaires ont été réalisés à l'extérieur de ces chambres, afin d'évaluer la NASBA Panfungi en fonction du niveau de contamination fongique. Pour chaque prélèvement, les résultats de la NASBA ont été confrontés à ceux obtenus par la méthode de surveillance classique, habituellement utilisée en hygiène hospitalière: la culture mycologique.

L'étude s'est déroulée en deux temps. Dans un premier temps, des prélèvements ont été réalisés dans trois secteurs différents du service d'hématologie du CHU de Grenoble, correspondant à trois niveaux de contamination de l'environnement (charge fongique nulle, faible ou élevée). Pour chaque point de prélèvement sélectionné, un double recueil (NASBA + culture) a été effectué. Dans un second temps, les échantillons destinés à la culture mycologique ont été analysés par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU. En

parallèle, les échantillons testés par NASBA ont été extraits et amplifiés au Centre Christophe Mérieux de Grenoble.

L'objectif de ce travail était d'évaluer les performances de la NASBA Panfungi par rapport à la culture fongique. Nous avons tout d'abord évalué la concordance entre les deux méthodes, en fonction de l'environnement étudié (air ou surface, niveau de contamination du secteur). Nous avons ensuite évalué la quantification en ARN ribosomique exprimée par les prélèvements détectés en NASBA et comparé ce taux à la charge fongique estimée par les prélèvements positifs en culture.

Matériels et méthodes

1. Présentation du service d'hématologie

Cette étude a été réalisée à partir de prélèvements d'air et de surfaces réalisés dans l'unité C du service d'hématologie du CHU de Grenoble. Cette unité, rénovée en 2008, se situe au 5ème étage du bâtiment A. Michallon. Les patients hospitalisés dans ce service sont traités par des chimiothérapies aplasiantes et sont particulièrement à risque d'infections fongiques invasives. L'entrée dans cette unité est contrôlée et s'effectue par un sas. Tout entrant doit revêtir une sur-blouse, une charlotte, des sur-chaussures et se laver les mains. On pénètre ainsi dans le couloir central de l'unité qui permet d'accéder aux chambres des patients ou à l'office infirmier. Ces chambres sont individuelles, séparées du couloir par un sas et comportent un système de filtration de l'air de haute efficacité HEPA (filtration de particules $< 0.3 \mu\text{m}$), associé à un renouvellement avec flux unidirectionnel (20 volumes par heure). Une cascade de pression positive (surpression d'au moins 15 kPa) entre la chambre, le sas de séparation et le couloir de l'unité, permet d'éviter la contamination par l'air extérieur (non traité). Le matériel de soin reste dans la chambre et le bionettoyage des surfaces est réalisé quotidiennement, par un agent d'entretien qui respecte les conditions d'entrée dans ce secteur. Conformément aux exigences de la norme NF EN 1275, les désinfectants de surface utilisés ont une action fongicide sur de nombreuses souches de levures et de moisissures (réduction de 4 log en 15 minutes de la concentration des souches de *C. albicans* et *A. niger*) (191). Enfin, la maîtrise de l'eau, potentiellement vecteur de spores fongiques, est assurée par une microfiltration terminale (filtres $0.22 \mu\text{m}$).

2. Points de prélèvements

Trois zones de prélèvement ont été choisies pour l'étude, en fonction du degré attendu de contamination fongique.

2.1. Zone 1

Cette zone regroupe l'ensemble des chambres stériles du service. Ces chambres doivent respecter au minimum la classification ISO 7 selon la norme NF S90 351 (192). La contamination microbiologique attendue est nulle.



Figure 18: Chambre stérile du service d'hématologie

2.2. Zone 2

Cette zone regroupe l'office infirmier, le couloir central de l'office, ainsi que les sas de séparation des chambres. La contamination microbiologique attendue est faible.



Figure 19: Office infirmier du service d'hématologie

2.3. Zone 3

Cette zone est constituée par le hall d'ascenseur du 5ème étage de l'hôpital. Les dispositifs de ventilation d'air du CHU sont équipés d'un système de filtration (efficacité minimale de 85% évaluée par méthode opacimétrique). Malgré cette filtration, l'environnement est ici exposé aux particules de l'air extérieur (vectorisées notamment par l'homme) et le niveau de contamination fongique attendu est élevé.



Figure 20: Hall du 5è étage du CHU (Bâtiment A. Michallon)

Zone de prélèvement	Lieu	Prélèvements de surfaces	Prélèvements d'air	Niveau de contamination attendu
1	Chambre	12	1	0 UFC
2	Couloir et Hall infirmier	2	2	Faible
3	Hall ascenseur	1	1	Elevé

UFC: Unité Formant Colonie

Tableau VI: Répartition des points de prélèvement par campagne

La localisation des prélèvements réalisés dans chaque campagne est détaillée en annexe.

3. Réalisation des prélèvements

3.1. Réalisation des prélèvements de surfaces

Pour chaque point de prélèvement de surfaces, deux échantillonnages ont été réalisés:

- **Un échantillonnage par écouvillon (Copan[®]):** application à l'intérieur d'une surface carrée de 25 cm² d'un écouvillon humidifié par un tampon d'extraction (bioMérieux, 300 µL contenus dans un tube BD Falcon[™] de 15mL).

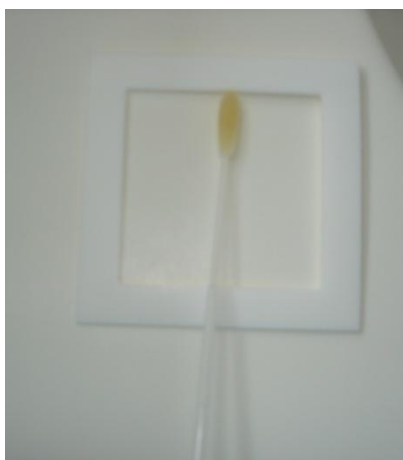
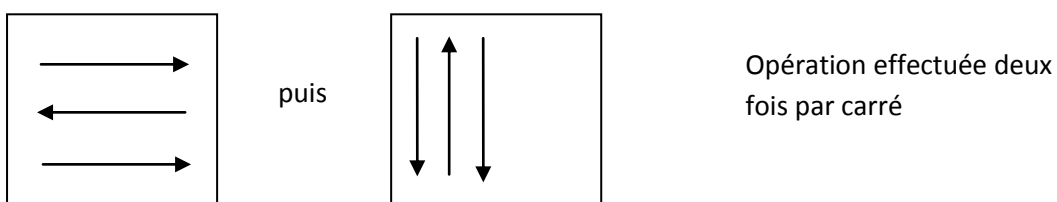


Figure 21: Prélèvement par écouvillonnage

Les prélèvements ont été effectués comme décrit ci-dessous :



L'écouvillon était ensuite agité dans le tampon pour faciliter la mise en suspension des particules prélevées, égoutté sur les parois du tube Falcon[™] et éliminé. Cette suspension (environ 250 µl) était ensuite utilisée pour l'extraction des acides nucléiques puis l'amplification NASBA.

- **Un échantillonnage par gélose contact (Count-tact[®] bioMérieux):** application d'une gélose contact de 55 mm de diamètre, à l'aide d'un applicateur, permettant

ainsi d'obtenir un temps de contact et une pression équivalente pour chaque prélèvement.



Figure 22: Applicateur et gélose contact

Les géloses utilisées sont des géloses Sabouraud irradiées, spécialement conçues pour l'utilisation en zone propre. Ces géloses contiennent des agents neutralisants qui inactivent la plupart des désinfectants habituels.

Pour un même site de prélèvement, il n'a pas été possible de réaliser les deux échantillonnages (écouvillon et contact) exactement sur la même surface, ceux-ci ont donc été réalisés sur des surfaces contigües.

3.2. Réalisation des prélèvements d'air

Pour chaque site de prélèvement, l'air a été collecté à l'aide de deux bio-impacteurs d'air:

- **Le bio-impacteur Air Ideal (bioMérieux):** aspiration de 1000 litres d'air en 10 minutes et dépôt des particules sur une gélose Sabouraud de 90 mm de diamètre.

Ce préleveur d'air fonctionne selon le principe de l'impaction directe, décrite par Andersen (25,101,193). Ce préleveur est extrêmement efficace pour recueillir des particules microbiologiques d'un diamètre de 2,1 à 14 μm , selon la norme ISO 14698-1 (192).



Figure 23: Bio-impacteur Air Ideal

- **Le bio-impacteur MASS (bioMérieux):** ce prototype développé par bioMérieux permet une aspiration de 1000 litres d'air en 20 min (50L/min) : les particules sont piégées à travers un dispositif nommé *peppermill air* (cylindre contenant un gel, associé à des billes métalliques, permettant la rétention et la lyse des particules filtrées).



Figure 24: Bio-impacteur MASS

Afin de limiter au maximum les perturbations et les contaminations des flux d'air, les prélèvements ont été effectués dans des pièces fermées (chambre, sas ou office infirmier) et les deux impacteurs ont fonctionné simultanément, à une distance d'au moins deux mètres l'un de l'autre. De plus, il était nécessaire de perturber le moins possible les patients hospitalisés dans ce service (risque de vectorisation de contaminants microbiologiques ou de nuisances sonores). C'est pourquoi, la plupart des prélèvements de surfaces et la totalité des prélèvements d'air ont été réalisés dans des chambres n'hébergeant pas de patient au moment de l'étude.

4. Traitement des prélèvements

Pour chaque point de prélèvement (air ou surface), 2 échantillonnages ont été réalisés. Les géloses Sabouraud ont été incubées dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IBP du CHU de Grenoble. En parallèle, les tubes BD FalconTM (contenant la suspension des écouvillonnages réalisés sur les surfaces), et les *peppermill air* ont été acheminés à température ambiante au centre Christophe Mérieux et analysés par la NASBA.

4.1. Mise en culture des prélèvements et identification fongique

Les géloses contacts et les géloses Sabouraud 90 mmensemencées ont été incubées 7 jours à 27°C, et les cultures observées toutes les 48h à 72h, jusqu'à J7.

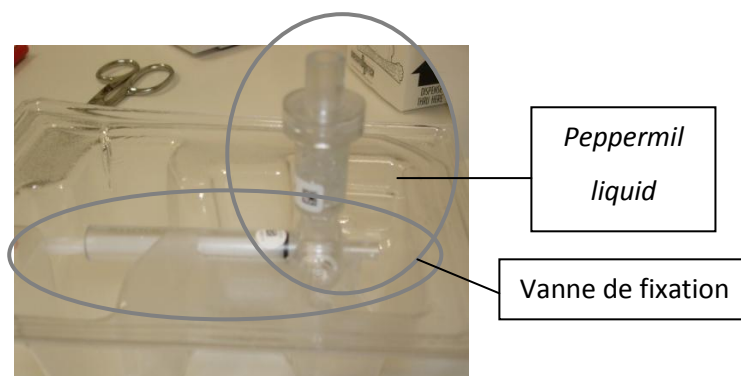
L'identification des champignons filamenteux a nécessité dans un premier temps l'étude de critères macroscopiques, tels que l'aspect et la couleur des colonies. Cette observation a été complétée dans un deuxième temps par un examen microscopique des éléments fongiques après coloration au bleu de lactophénol (structure du thalle, pigmentation, présence de vésicules ou de chlamydospores, mode de groupement et aspect des conidies, aspect des spores...). Cette identification a été réalisée selon le mode opératoire décrit dans le guide de bonne exécution des analyses du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble (PAM-MYC-MPO-026).

L'identification des levures a nécessité l'emploi de tests de détection rapides ou l'utilisation de galeries d'identification ID 32C (bioMérieux). Ces tests d'identification, basés sur l'étude des caractères physiologiques des levures (assimilation et fermentation des glucides), ont été réalisés selon les modes opératoires décrits dans les procédures PAM-MYC-MPO-016, PAM-MYC-MPO-017 et PAM-MYC-MPO-018 (GBEA laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Grenoble).

4.2. Traitement des échantillons par biologie moléculaire

4.2.1. Lyse des particules et extraction des acides nucléiques

La lyse des particules et l'extraction des acides nucléiques ont été réalisées sur le prototype d'automate POP 1, développé par bioMérieux. Afin de réduire le temps d'extraction, trois prototypes identiques de cet automate ont été utilisés en parallèle.



Figures 25a et 25b: Extracteur POP 1 (à gauche) et dispositif de fixation du *peppermill* (à droite)

L'extraction des acides nucléiques issus des prélèvements de surfaces a nécessité un prétraitement: après centrifugation rapide du tube BD FalconTM, la totalité de la suspension a été transférée dans un *peppermill liquid* (dispositif de même format que le *peppermill air*, adapté aux prélèvements liquides).

Le peppermill (air ou liquid) a été introduit dans le POP 1, via une vanne de fixation. La première étape consistait en une lyse mécanique (environ 3 minutes). Le culot résultant de la lyse mécanique a été transféré manuellement dans un eppendorf contenant une suspension de silice dans un tampon de lyse (thiocyanate de guanidium). A partir de cette nouvelle suspension, le POP1 effectue automatiquement les étapes suivantes: lyse chimique du broyat cellulaire, extraction et purification des acides nucléiques recueillis. La silice est ensuite piégée par un aimant et l'extrait d'acides nucléiques transféré dans un eppendorf. Vingt cinq à 30 μ L d'extrait ont ainsi été récupérés par l'extraction puis conservés à -20°C.

Avant toute série, un blanc de contrôle a été effectué sur chaque POP 1. Pour cela, 300 µL de tampon d'extraction stérile ont été introduits dans un *peppermill liquid*, puis extraits et conservés à -20°C. Ces extraits ont été utilisés par la suite lors de l'étape d'amplification, comme témoins négatifs d'extraction.

4.2.2. Amplification des extraits d'acides nucléiques

Les ARN extraits ont été amplifiés par la technique NASBA mise au point par la société bioMérieux: la NASBA Panfungi. L'ARN cible est l'ARN 28S de la grande sous unité ribosomale des cellules fongiques (153). La préparation des réactifs et l'amplification NASBA ont été effectuées dans une pièce spécifique, afin de limiter au maximum les contaminations croisées.

4.2.2.1. Protocole d'amplification

➤ Préparation du mix d'amplification

Ce mélange réactionnel a été réalisé à partir de la trousse *Nuclisens EasyQ basic kit v2*[®] (bioMérieux), qui comprend les nucléotides, les enzymes et les autres réactifs nécessaires à l'amplification:

- Accusphères enzymes: sphères lyophilisées contenant de l'AMV-RT, de la RNase H et de l'ARN T7 Polymérase
- Accusphères réactifs: sphères lyophilisées contenant des nucléotides et du MgCl₂
- Diluant accusphère réactif: contient un tampon tris / HCL et du DMSO
- KCl : solution KCl à 1,2 mol/L, contient également un biocide (sans ADN ni ARN)
- Eau NW (NASBA Water): eau contenant un biocide

Aux réactifs du Nuclisens EasyQ basic kit ont été ajoutés:

- Un mélange amorces / balises: deux balises moléculaires différentes ont été utilisées. Les *molecular beacons* permettent la détection spécifique de deux cibles: l'ARN 28S (utilisation d'un fluorophore FAM-ARNr 28S) et le contrôle interne (fluorophore ROX-IC Panfungi). Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau VII.

Type d'amorce	Séquence (5'-3')
Forward primer	CGGCTCTTCCTATCATACCG
Reverse Primer	AATTCTAATACGACTCACTATAGGGCTAAACCCAGCTCA CGTTCC

Tableau VII: Amorces utilisées lors de l'amplification par NASBA Panfungi (153)

- Un contrôle interne: cette séquence nucléotidique permet de vérifier l'absence d'inhibiteur d'amplification (148). Le contrôle interne ne diffère de la séquence cible que par une courte fraction nucléotidique, laquelle permet son hybridation spécifique avec une balise moléculaire différente.

	Pour une barrette (8 puits)	Volume préparé dans le mix d'amplification (exemple pour 9 barrettes)
Eau NW	7,04 µL	63.4 µL
KCl 1,2 M	16,0 µL	144,0 µL
Diluant réactif	64,0 µL	576,0 µL
Mélange amorces / balises	8,0 µL	72,0 µL
Contrôle interne	0,96 µL	8.6 µL
Accusphères réactifs	1	9
Volume total	96,00 µL	864,0 µL

Tableau VIII: Protocole de préparation du mix réactionnel

➤ Préparation de la solution d'enzyme

Les accusphères enzymes ont été diluées dans de l'eau NW, selon le protocole suivant:

	Pour une barrette (8 puits)	Volume total (exemple pour 9 barrettes)
Accusphères enzymes	1	9
Eau NW	45 µL	405 µL

Tableau IX: Protocole de préparation de la solution d'enzyme

➤ Préparation d'une gamme de dilution de *C. albicans*

Des extraits d'ARN de *C. albicans* (bioMérieux) à des concentrations connues ont été amplifiés en parallèle. Cinq dilutions ont été réalisées, de 0,01 à 100 Geq / μ L (dilution effectuée dans de l'eau NW). Ces points de différentes concentrations ont été utilisés comme témoins positifs d'amplification de l'ARNr 28S des extraits testés. Cette gamme de dilution contient également un point de concentration nulle (eau NW) utilisé comme témoin négatif d'amplification.

➤ Préparation des puits réactionnels

Dix μ L du mix d'amplification ont été déposés dans chaque puits d'une barrette (barrettes de 8 puits PCR Greiner® 0,2 ml), dans lesquels 5 μ L des extraits à tester (ou 5 μ L de contrôle négatif d'amplification ou 5 μ L d'extrait de *C. albicans*), puis 10 μ L de la solution enzymatique ont été ajoutés. Les barrettes étaient réparties par plaques, chaque plaque pouvant contenir six barrettes.

Pour chaque série d'amplification, les extraits à tester ont été amplifiés en duplicate (excepté les témoins négatifs d'amplification, préparés en triplicate et les extraits de *C. albicans*, amplifiés une seule fois).

4.2.2.2. Incubation et amplification

Une étape de dénaturation a précédé l'amplification. Les barrettes ont été incubées dans un incubateur Nuclisens EasyQ® 360-390 (bioMérieux) 2 minutes à 65°C puis 2 minutes à 41°C.

L'étape d'amplification, entièrement automatisée, a été effectuée via l'amplificateur Nuclisens EasyQ® (bioMérieux). Chaque amplificateur ne pouvant traiter que six barrettes à la fois, l'étude a été réalisée en utilisant deux amplificateurs en parallèle. Les barrettes ont été disposées dans l'automate préchauffé à 41°C.

Les mesures continues effectuées par l'analyseur du Nuclisens EasyQ® permettent de mesurer en temps réel l'émission de fluorescence des groupements FAM (séquence cible) et ROX (séquence du contrôle interne). L'étape d'amplification dure une heure.

Barrette 1	Barrette 2	Barrette 3	Barrette 4	Barrette 5	Barrette 6
Gamme de <i>C. albicans</i> (en Geq / μ L)		Echantillons à tester			
500	S1	S4	S7	S10	S14
50	S1	S4	S7	S10	S14
5	S2	S5	S8	S11	S15
0,5	S2	S5	S8	S11	S15
0,05	S3	S6	S9	S12	S16
0	S3	S6	S9	S12	S16
0	Blanc POP 1	Blanc POP 1	Blanc POP 1	S13	S17
	EPO1	EPO2	EPO3		
0	Blanc POP 1	Blanc POP 1	Blanc POP 1	S13	S17
	EPO1	EPO2	EPO3		

Barrette 7	Barrette 8
Gamme C <i>albicans</i> (en Geq / μ L)	Echantillons à tester
500	Air 1
50	Air 1
5	Air 2
0,5	Air 2
0,05	Air 3
0	Air 3
0	Air 4
0	Air 4

S1 à 17 : échantillons *surface*

Air 1 à 4 : échantillons *air*

Blanc POP1 : Témoins négatifs d'extraction (EPO 1-2-3 : dénomination des POP1 utilisés)

0 : Témoins négatifs d'amplification

Tableau X: Exemple de répartition des extraits dans les puits réactionnels (exemple avec 8 barrettes, réparties sur 2 plaques)

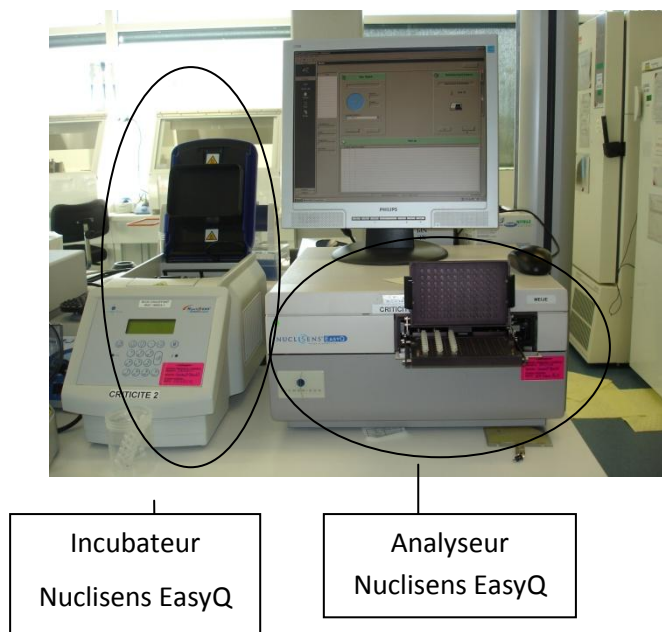


Figure 26: Automate d'amplification Nuclisens EasyQ®

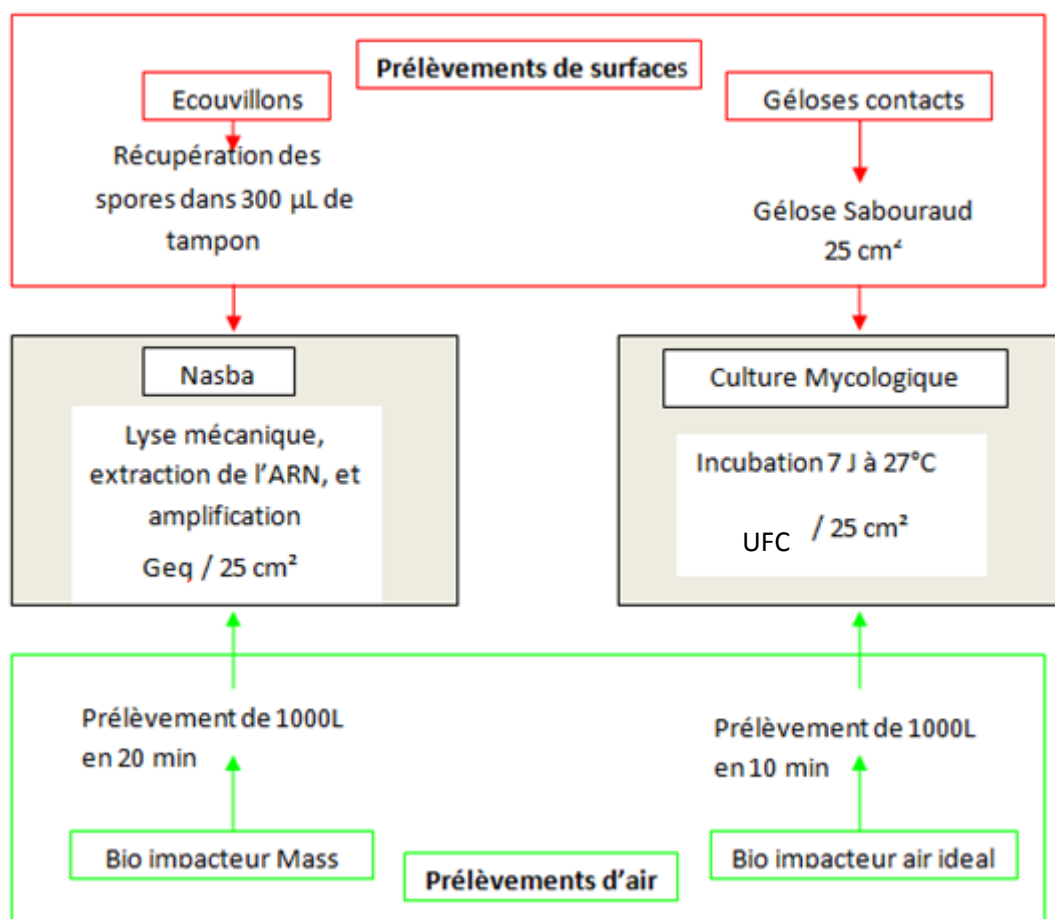


Figure 27: Schéma de traitement des prélèvements

5. Expression des résultats

5.1. Evaluation de la détection fongique

Les taux de contamination fongique estimés par la culture sont exprimés en Unité Formant Colonie (UFC) /25 cm² pour les prélèvements de surfaces et en UFC /m³ pour les prélèvements d'air. Les taux évalués par la NASBA sont exprimés en Génome-équivalent (Geq) /25 cm² pour les prélèvements de surfaces et Geq /m³ pour les prélèvements d'air.

5.2. Comparaison entre les deux techniques

	NASBA positive	NASBA négative
Culture positive	a	c
Culture négative	b	d

Tableau XI: Modélisation des résultats de détection fongique par culture et par NASBA (194)

Afin d'évaluer l'accord statistique entre la NASBA et culture, nous avons utilisé un test paramétrique Kappa de Cohen (195,196). Via un coefficient Kappa, ce test permet de chiffrer l'accord entre deux techniques qualitatives pour un même jugement, en tenant compte de la part de concordance due au hasard. Le coefficient Kappa a été interprété suivant le classement de Landis et Koch, fréquemment utilisé en biologie médicale (196):

Accord	Kappa
Très bon	>0.61
Modéré	0.21 - 0.60
Mauvais	0.00 - .20
Très mauvais	<0.00

Tableau XII: Interprétation du coefficient Kappa, selon Landis et Koch

La valeur du coefficient Kappa est donnée par la formule: $K = (P_o - P_a) / (1 - P_a)$

Avec **P_o**: taux de concordance observé et **P_a**: taux de concordance du au hasard

Lorsque les événements observés dans une comparaison statistique ont une trop faible prévalence, il est nécessaire d'utiliser un coefficient Kappa corrigé, ajusté à la prévalence. En prenant pour hypothèse de départ que les événements positifs et négatifs (dans l'étude: détection ou non d'une contamination fongique) ont la même prévalence, le calcul du coefficient Kappa ajusté s'effectue en utilisant la modélisation du tableau XIII ci-dessous (195).

	NASBA positive	NASBA négative
Culture positive	$(a+d) / 2$	c
Culture négative	b	$(a+d) / 2$

Tableau XIII: Modélisation des résultats de détection fongique par culture et par NASBA, avec prévalence identique des événements positifs et négatifs

Résultats

Douze campagnes de prélèvements de surfaces et onze campagnes de prélèvements d'air ont été réalisées du 06/06/11 au 26/09/11 correspondant à 206 prélèvements de surfaces et 44 prélèvements d'air. Les trois zones de prélèvements décrites précédemment, avec des niveaux de maîtrise de l'environnement différents ont été étudiées:

- Zone 1= Chambres stériles de l'unité d'hématologie: 144 prélèvements de surfaces, 11 prélèvements d'air
- Zone 2= Sas, couloir et office infirmier du service: 50 prélèvements de surfaces, 22 prélèvements d'air
- Zone 3= Hall ascenseur du 5^e étage: 12 prélèvements de surfaces, 11 prélèvements d'air.

1. Résultats de la culture fongique

1.1. Prélèvements en zone 1

Douze prélèvements de surfaces et un prélèvement d'air par campagne ont été réalisés en zone 1. Sur 144 prélèvements de surfaces et 11 prélèvements d'air, 7 n'ont pas été retenus pour l'étude comparative (5 prélèvements de surfaces et 2 prélèvements d'air). En effet, dans ces 7 prélèvements, aucune amplification du contrôle interne n'a pu être obtenue en biologie moléculaire. L'absence d'amplification du contrôle interne dans un prélèvement ne permettant pas de valider la technique NASBA, la comparaison entre les deux méthodes n'était pas possible. Dans cette zone, le taux de positivité des prélèvements de surfaces est de 7,91% avec un taux de contamination moyen de 0,24 UFC /25cm². Le taux de positivité des prélèvements d'air est de 55,56% avec un taux de contamination moyen de 1,00 UFC /m³ (Tableau XIV).

1.2. Prélèvements en zone 2

Quatre prélèvements de surfaces et 2 prélèvements d'air par campagne ont été réalisés en zone 2 et répartis entre le sas, l'office infirmier et le couloir central de l'unité (soit pour l'étude: 50 prélèvements de surfaces et 22 prélèvements d'air). Lors des campagnes 1 et 6, un prélèvement de surface supplémentaire a été réalisé. Un prélèvement d'air (campagne 1) a été exclu de l'étude (absence d'amplification du contrôle interne par la technique NASBA). Dans cette zone, le taux de positivité des prélèvements de surfaces est de 22,00% avec un taux de contamination moyen de 0,56 UFC /25cm². Le taux de positivité des prélèvements d'air est de 100% avec un taux de contamination moyen de 4,14 UFC /m³ (Tableau XIV).

1.3. Prélèvements en zone 3

Douze prélèvements de surfaces et 10 prélèvements d'air ont été réalisés lors de l'étude dans cette zone à environnement non maîtrisé. Deux prélèvements d'air ont été exclus de l'étude (absence d'amplification du contrôle interne par la technique NASBA). Le taux de positivité des prélèvements de surfaces et d'air est de 100%, avec un taux de contamination moyen des prélèvements d'air de 29,00 UFC /m³ (Tableau XIV).

Compte tenu de l'envahissement fréquent par les moisissures des géloses contacts dans ce secteur, la quantification fongique des prélèvements de surfaces n'a pas été réalisée.

	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Surfaces: cultures positives	11/139 (7,91%)	11/50 (22,00%)	12/12 (100%)
UFC /25 cm ² *	0,24 +/- 1,46	0,56 +/- 1,85	Non applicable
Air: cultures positives	5/9 (55,56%)	21/21 (100%)	8/8 (100%)
UFC /m ³ *	1,00 +/- 1,58	4,14 +/- 3,88	29,00 +/- 15,23

Tableau XIV: Taux de prélèvements positifs évalués par la culture et moyenne du nombre de colonies (UFC +/- SD) en fonction de la zone prélevée. * moyennes réalisées en considérant les résultats négatifs (0 UFC) et positifs. *Détails des résultats en annexes 1 et 2.*

1.4. Identification fongique

La répartition des principaux isolats fongiques identifiés sur les milieux de culture est présentée ci-dessous. Bien que certains n'aient pu être totalement identifiés, nous sommes assurés que ces isolats ne correspondaient pas à des champignons opportunistes majeurs. Pour les autres, l'identification a été effectuée jusqu'au rang de genre (à l'exception de certains *Aspergillus*, identifiés jusqu'au rang d'espèce).

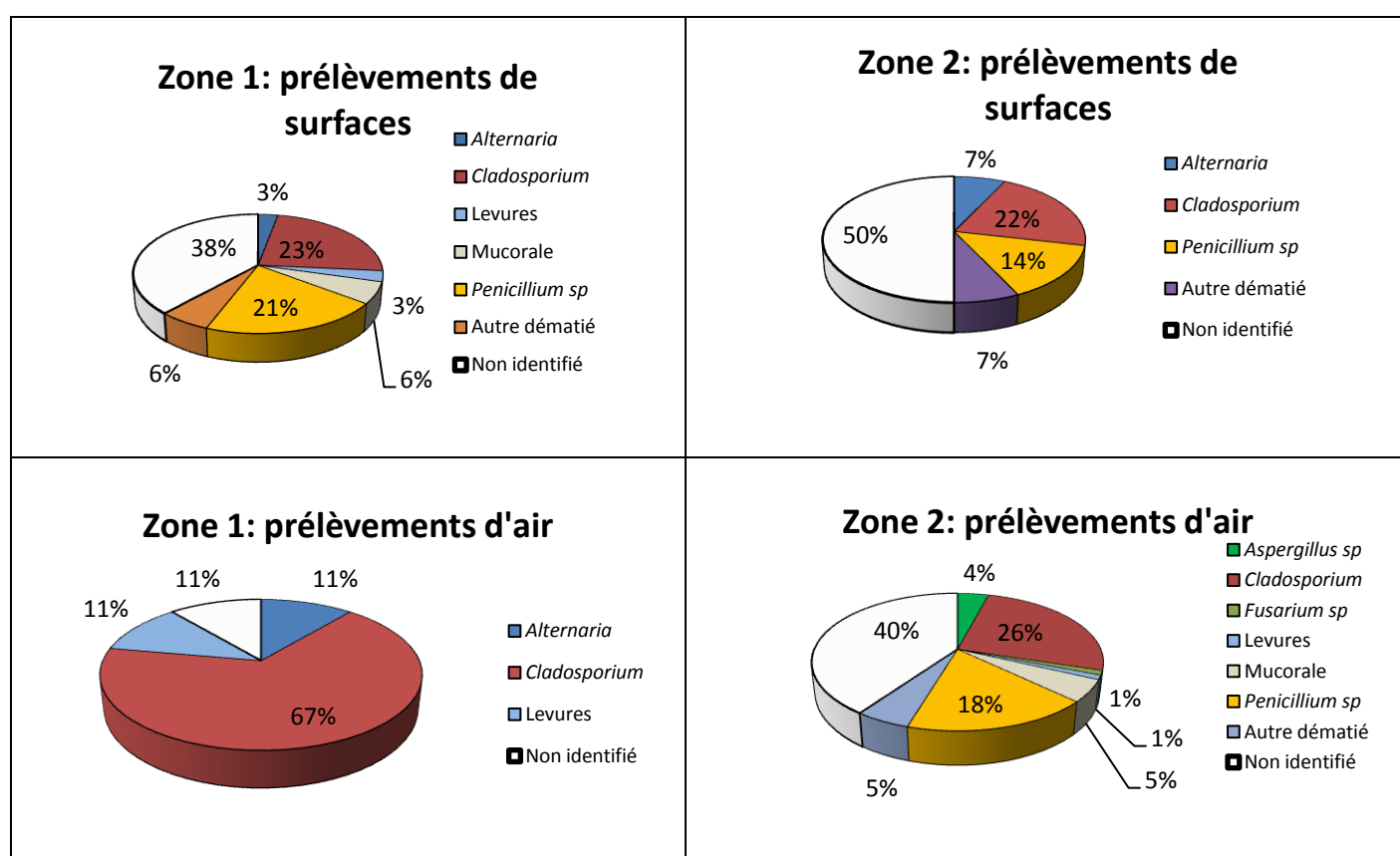


Figure 28: Répartition des principales souches fongiques identifiées sur les milieux de culture

L'analyse des cultures effectuées sur les échantillonnages de surfaces montre une prédominance des genres *Cladosporium* sp et *Penicillium* sp. Aucune colonie d'*Aspergillus* sp n'a été retrouvée dans ces deux zones. L'analyse des prélèvements d'air fait également apparaître une prédominance des genres *Cladosporium* sp et *Penicillium* sp. En zone 2, des isolats d'*Aspergillus* sp ont été détectés dans l'air, alors qu'ils n'ont pas été retrouvés sur les surfaces. En zone 3, le dénombrement des colonies s'est avéré impossible, du fait de l'envahissement fréquent des boîtes de cultures (en particulier par des souches de l'ordre des

Mucorales). Néanmoins, les genres *Cladosporium* sp et *Penicillium* sp, ainsi que d'assez nombreux isolats du genre *Aspergillus* (dont *A. fumigatus*) ont été fréquemment retrouvés.

2. Résultats de la détection fongique par NASBA et comparaison à la culture

2.1. Résultats de la NASBA

	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Surfaces : NASBA positives	12/139 (8,63%)	13/50 (26,00%)	12/12 (100%)
Geq /25 cm ² *	0,41 +/- 1,85	0,78 +/- 1,67	182,17 +/- 220,11
Air: NASBA positives	6/9 (66,67%)	17/21 (80,95%)	8/8 (100%)
Geq /m ³ *	3,95 +/- 7,58	5,05 +/- 5,95	82,12 +/- 93,53

Tableau XV: Taux de prélèvements positifs évalués par NASBA et moyenne du nombre de colonies (UFC +/- SD) en fonction de la zone prélevée. * moyennes réalisées en considérant les résultats négatifs (0 Geq) et positifs. *Détails des résultats en annexes 1 et 2.*

2.2. Comparaison qualitative : évaluation de la concordance entre la NASBA et la culture fongique

Afin de comparer les performances de la NASBA par rapport à la culture fongique, nous avons calculé les taux de concordance positifs et négatifs entre ces techniques, ainsi que le taux de concordance global. Le coefficient Kappa, proposé par Cohen, nous a permis d'évaluer la qualité de cet accord (195).

Dans les tableaux suivants, la concordance entre les deux méthodes est présentée dans chaque zone puis les taux de concordance et le coefficient Kappa ont été calculés à partir de l'ensemble des résultats (tableaux XVI à XXVII).

2.2.1. Evaluation de la concordance des prélèvements de surfaces

2.2.1.1. Calcul des taux de concordance

Zone 1	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	3	8	11
Culture négative	9	119	128
Total	12	127	139

Tableau XVI: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture, sur les prélèvements de surfaces en zone 1

Zone 2	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	7	4	11
Culture négative	6	33	39
Total	13	37	50

Tableau XVII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture, sur les prélèvements de surfaces en zone 2

Zone 3	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	12	0	12
Culture négative	0	0	0
Total	12	0	12

Tableau XVIII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture, sur les prélèvements de surfaces en zone 3

Zones 1+2+3	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	22	12	34
Culture négative	15	152	167
Total	37	164	201

Tableau XIX: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur l'ensemble des prélèvements de surfaces (n=201)

Les taux de concordance calculés selon la méthode proposée par la FDA (194) sont les suivants:

- **Taux de concordance positive:** $22/34 = 64,70\%$

- **Taux de concordance négative:** $152/167 = 91,02\%$
- **Taux de concordance global:** $(22+152)/201 = 86,57\%$.

Le taux global de discordance est de 13.43% (27/201). 12 prélèvements positifs en culture n'ont pas été détectés en biologie moléculaire et à l'inverse, 15 prélèvements positifs en NASBA Panfungi ont été considérés négatifs après culture sur milieu Sabouraud. Les taux de discordances correspondant sont de 5,97% (12/201, prélèvements positifs uniquement en culture) et 7,46% (15/201, prélèvements positifs uniquement en NASBA).

2.2.1.2. Calcul du degré d'accord Kappa

Surfaces	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	22	12	34
Culture négative	15	152	167
Total	37	164	201
Po		0,87	
Pa		0,71	
Kappa		53,8%	

Tableau XX: Evaluation de l'accord entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements de surfaces (ensemble des trois zones)

En cumulant les données des trois zones d'étude, le degré d'accord (estimé par le coefficient Kappa) entre les deux méthodes pour les prélèvements de surfaces est évalué à **53,8%**. Cet accord entre les deux méthodes est considéré comme étant modéré, d'après l'échelle établie par Landis et Koch (195). Néanmoins, la faible prévalence observée d'événements positifs (détection d'une contamination fongique) entraîne une sous estimation du coefficient Kappa (195). En tenant compte de ce biais de prévalence, l'accord entre les deux méthodes est alors estimé par un coefficient de **73,1%** ce qui correspond à un accord fort.

Surfaces	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	87	12	99
Culture négative	15	87	102
Total	102	99	201
Po		0,87	
Pa		0,50	
Kappa ajusté		73,1%	

Tableau XXI: Evaluation de l'accord **ajusté au biais de prévalence** entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements de surfaces

2.2.2. Evaluation de la concordance des prélèvements d'air

2.2.2.1. Calcul des taux de concordance

Zone 1	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	4	1	5
Culture négative	2	2	4
Total	6	3	9

Tableau XXII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air en zone 1

Zone 2	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	17	4	21
Culture négative	0	0	0
Total	17	4	21

Tableau XXIII: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air en zone

2

Zone 3	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	8	0	8
Culture négative	0	0	0
Total	8	0	8

Tableau XXIV: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air en zone

3

Zones 1+2+3	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	29	5	34
Culture négative	2	2	4
Total	31	7	38

Tableau XXV: Concordance entre la NASBA Panfungi et la culture sur l'ensemble des prélèvements d'air (n=38)

Les taux de concordance calculés selon la méthode proposée par la FDA sont les suivants:

- **Taux de concordance positive** : $29/34 = 85,29\%$
- **Taux de concordance négative** : $2/4 = 50,00\%$
- **Taux de concordance global** : $(29+2)/38 = 81,58\%$.

Le taux global de discordance est de 18.42% (7/38). Cinq prélèvements positifs en culture n'ont pas été détectés en biologie moléculaire et à l'inverse, 2 prélèvements positifs en NASBA Panfungi ont été considérés négatifs après culture sur milieu Sabouraud. Les taux de discordances correspondant sont de 13,16% (5/38 prélèvements positifs uniquement en culture) et 5,26% (2/38 prélèvements positifs uniquement en NASBA).

2.2.2.2. Calcul du degré d'accord Kappa

Air	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	29	5	34
Culture négative	2	2	4
Total	31	7	38
Po		0,82	
Pa		0,75	
Kappa		26,5%	

Tableau XXVI : Evaluation de l'accord entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air (ensemble des trois zones)

En cumulant les données des trois zones d'étude, le degré d'accord (estimé par le coefficient Kappa) entre les deux méthodes pour les prélèvements d'air est évalué à **26,5%**. Cet accord entre les deux méthodes est considéré comme médiocre, d'après l'échelle établie par Landis et Koch (195). Néanmoins, il faut également tenir compte ici de la prévalence des événements

observés, qui sous estime ce coefficient. La valeur du coefficient Kappa ajusté sur la prévalence est de **63,4%**, ce qui correspond à un accord fort.

Air	NASBA positive	NASBA négative	Total
Culture positive	15,5	5	20,5
Culture négative	2	15,5	17,5
Total	17,5	20,5	38
Po		0,82	
Pa		0,50	
Kappa		63,4%	

Tableau XXVII: Evaluation de l'accord ajusté au biais de prévalence entre la NASBA Panfungi et la culture sur les prélèvements d'air

2.3. Comparaison quantitative

Les taux de contamination évalués par la NASBA (Geq /25cm² ou /m³) ont été comparés à ceux évalués par la culture fongique (UFC /25cm² ou /m³). L'envahissement fréquent des boîtes de culture en zone 3 ne permettant pas un dénombrement précis des colonies fongiques, seuls les prélèvements provenant des zones 1 et 2 ont ici été considérés. De plus, seuls les prélèvements positifs en NASBA Panfungi et / ou en culture ont été considérés lors de cette comparaison.

Prélèvements positifs	NASBA	Culture
Surfaces (Zone1 / Zone 2)	13/11	11/11
Air (Zone1 / Zone 2)	6/17	5/21

Tableau XXVIII : Nombre de prélèvements positifs sur l'ensemble de l'étude (en zones 1 et 2)

Les figures 29 et 30 ci-dessous présentent les charges fongiques moyennes obtenues sur les prélèvements positifs d'air et de surfaces en culture et /ou en NASBA dans ces deux zones.

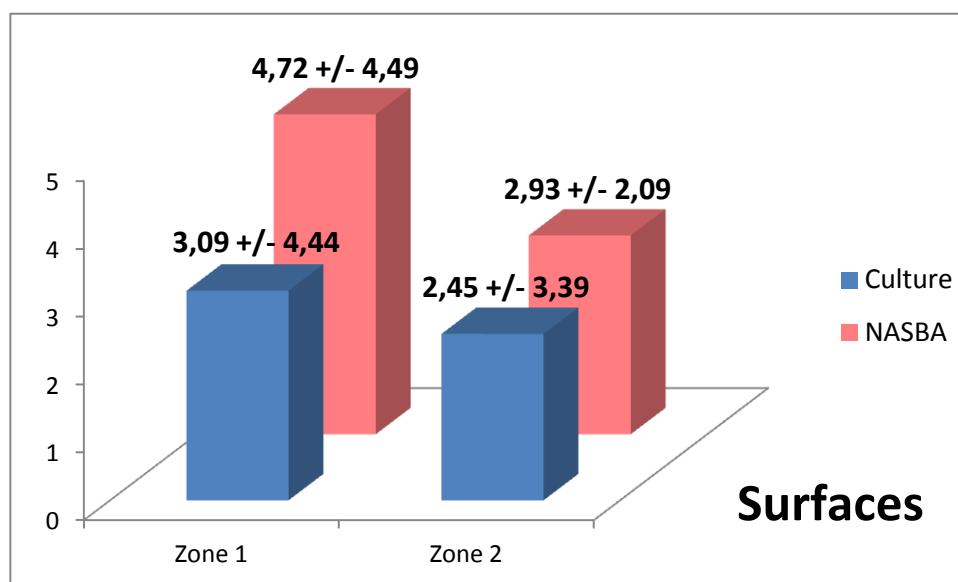


Figure 29: Représentation de la charge fongique moyenne évaluée sur les surfaces en zones 1 et 2 en UFC /25cm² (+/-SD) et en Geq /25cm² (+/- SD)

La charge fongique moyenne estimée par la NASBA **sur les prélèvements positifs de surfaces** est de 4,72 Geq /25cm² en zone 1 et de 2,93 Geq /25cm² en zone 2 (à partir de 13 et 11 prélèvements respectivement). La culture fongique évalue cette charge à 3,09 UFC /25cm² en zone 1 et à 2,45 UFC /25cm² en zone 2 (11 prélèvements positifs dans chaque zone).

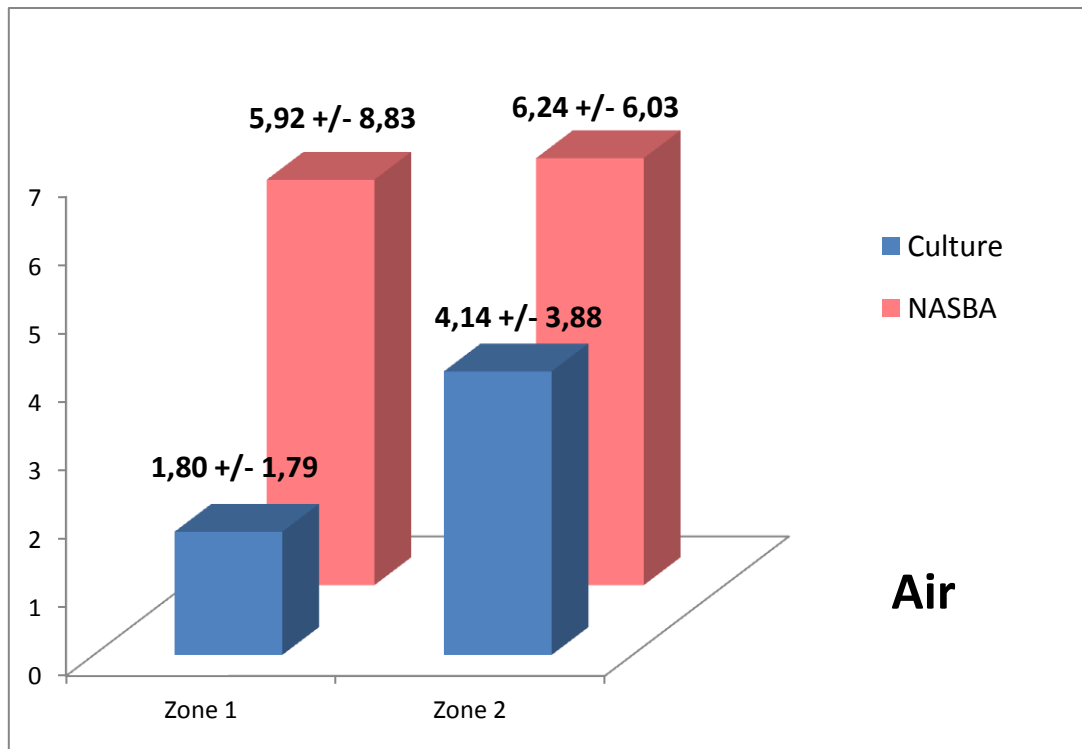


Figure 30: Représentation de la charge fongique moyenne évaluée dans l'air en zones 1 et 2 en UFC /m³ (+/-SD) et en Geq /m³ (+/- SD)

La charge fongique moyenne estimée par la NASBA **sur les prélèvements d'air positifs** est de 5,92 Geq /m³ en zone 1 et de 6,24 Geq /m³ en zone 2 (à partir de 6 et 17 prélèvements respectivement). La culture fongique évalue cette charge à 1,80 UFC /m³ en zone 1 et à 4,14 UFC /m³ en zone 2 (à partir de 5 et 21 prélèvements respectivement).

2.4. Synthèse des principaux résultats

Au final, les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

La comparaison des résultats des prélèvements de **surfaces** montre une concordance globale de **86,57%**, avec des discordances de **5,97%** (prélèvements négatifs en NASBA et positifs en culture) et **7,46%** (prélèvements positifs en NASBA et négatifs en culture). La comparaison des résultats des prélèvements d'**air** montre une concordance globale de **81,58%**, avec des discordances **13,16%** (prélèvements positifs uniquement en culture) et **5,26%** (prélèvements positifs uniquement en NASBA).

L'accord entre les deux méthodes est considéré fort, d'après le calcul des coefficients Kappa (ajustés à la prévalence): **73,1%** (prélèvements de surfaces) et **63,4%** (prélèvements d'air).

Lors de la comparaison des charges fongiques détectées par les deux méthodes, il n'a pas été possible de réaliser une véritable étude statistique de corrélation entre les taux de contamination exprimés en UFC et ceux exprimés en Geq. En effet, le nombre d'échantillons évalués (prélèvements positifs en NASBA Panfungi et / ou en culture fongique) était trop faible pour cette analyse.

Discussion

Les conséquences sur la santé humaine de l'aéro-biocontamination peuvent être très variées et dépendent des caractéristiques du milieu (température, humidité), de la charge fongique et du type d'espèce, ainsi que des caractéristiques immunologiques de l'hôte (patient immunodéprimé ou sensibilisé à un allergène...) (1,25,27,51,69). Dans le domaine aérospatial, la présence de micro-organismes fongiques dans l'environnement des stations spatiales peut altérer l'intégrité des matériaux et de l'équipement, ainsi que la santé des spationautes, dont l'immunité est dérégulée (22,23). L'aéro-contamination fongique constitue également une problématique très importante en secteur hospitalier, où la maîtrise de l'environnement est un préalable indispensable à la prévention des infections fongiques invasives chez les patients à haut risque. Cette maîtrise repose essentiellement sur des systèmes de traitement de l'air (basés sur la filtration haute efficacité) et l'organisation de mesures visant à séparer le patient immunodéprimé des nombreuses sources de spores (hébergement en unités protégées). Des prélèvements microbiologiques, basés principalement sur la collecte et la culture de spores fongiques permettent ensuite d'évaluer l'efficacité de ces mesures de prévention (19,197). En France, la Haute Autorité de Santé (HAS) impose que pour chaque établissement de santé, l'organisation de ces contrôles fasse l'objet de procédures spécifiques. Par ailleurs, l'association de prélèvements d'air et de surfaces est recommandée par le comité technique national des infections nosocomiales et des infections liées aux soins (CTINILS) (75).

En hématologie, les recommandations émises par le CLIN du CHU de Grenoble prévoient un contrôle mensuel de l'environnement d'une chambre hébergeant un patient (classée ISO 7). Ce contrôle associe 7 prélèvements de surfaces (utilisation de géloses contacts) et un prélèvement de 500 L d'air (réalisé par impaction sur une gélose Sabouraud). Ces méthodes de détection de la flore fongique ont toutefois plusieurs limites. Outre leur sensibilité assez médiocre et la sous-estimation probable de la charge fongique réelle, l'obtention des résultats nécessite des durées d'incubation longues (de plusieurs jours). Ces délais retardent les actions curatives à apporter en cas de contamination avérée d'un secteur protégé: vérification du traitement de l'air et administration éventuelle d'un traitement probabiliste.

Dans ce contexte, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, par leur rapidité, apparaît très intéressante et apporterait des solutions aux contraintes des méthodes de culture mycologiques classiques. De cette exigence de maîtrise de la contamination microbienne dans

l'industrie aéronautique est né en 2001 le projet MiDASS. Cette collaboration entre l'Agence Spatiale Européenne (ESA) et la société bioMérieux vise à mettre au point un système automatisé d'évaluation de la biocontamination fongique et bactérienne par une technique de biologie moléculaire qualitative et quantitative nommée NASBA. Décrite par Jean Compton en 1991, cette technologie permet une amplification isotherme d'acides nucléiques. La détection et l'amplification de la cible est effectuée en temps réel, ce qui permet de réduire le temps d'analyse et de limiter le risque de contamination des échantillons (contrairement aux méthodes en point final, les tubes d'amplification ne sont jamais rouverts).

La NASBA Panfungi est une méthode d'amplification de l'ARNr 28S commun au règne fongique. L'objectif de la société bioMérieux est l'intégration de cette technologie dans un dispositif miniaturisé de détection rapide de la contamination environnementale. En 2009 et 2010, les travaux issus d'une collaboration entre le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble et bioMérieux ont permis d'évaluer les performances de la NASBA Panfungi sur des isolats fongiques de laboratoire (189,190). La spécificité de la technique (établie à partir de 100 isolats fongiques et 6 isolats bactériens) a été évaluée à 100% et la sensibilité analytique (établie à partir de souches d'*A. fumigatus*, d'*A. niger*, de *Penicillium* sp, de *Cladosporium* sp, de *Fusarium* sp et d'*Alternaria* sp) a été évaluée à 0,5 spores par NASBA).

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer les performances de la NASBA Panfungi par rapport à la culture mycologique dans la détection de spores fongiques dans un environnement très faiblement contaminé, écologiquement proche de l'environnement des navettes spatiales. Trois zones d'études, correspondant à trois atmosphères de contamination fongique différentes de l'unité d'hématologie du CHU de Grenoble et comprenant un secteur à environnement maîtrisé, ont été choisies. Dans chaque environnement, des prélèvements d'air et de surfaces ont été réalisés et les échantillons prélevés ont été analysés en parallèle par la NASBA Panfungi et par la culture mycologique. La comparaison des résultats des **prélèvements de surfaces** montre une très bonne concordance entre les deux techniques, avec une concordance globale de **86,57%**, estimée sur 201 prélèvements. Pour ces prélèvements, le coefficient Kappa de Cohen ajusté à la prévalence est évalué à 73,1% confirmant un agrément fort entre les deux méthodes. De plus, le taux d'accord négatif observé (91,02%) très élevé montre que les deux techniques seraient équivalentes en cas de résultat négatif sur des prélèvements de surfaces. Cette observation est particulièrement intéressante dans le domaine de l'évaluation de la contamination fongique des secteurs « à risque », pour lesquels l'absence

de contamination fongique est l'objectif recherché (zone ISO 7, navette spatiale..). Concernant **les prélèvements d'air**, la concordance entre les deux techniques est également bonne, avec un taux de concordance global de **81,58%** et un agrément fort estimé par le coefficient Kappa de Cohen ajusté à la prévalence (63,4%).

Certaines discordances entre les résultats obtenus par les deux méthodes ont néanmoins été constatées, avec des taux de 13,43% (27/201) pour les prélèvements de surfaces et de 18,42% (7/38) pour les prélèvements d'air. Plusieurs prélèvements positifs en culture fongique n'ont notamment pas été détectés par la NASBA Panfungi. Ces écarts entre les deux techniques représentent 5,97% (12/201) des prélèvements de surfaces ainsi que 13,16% (5/38) des prélèvements d'air et concernent exclusivement les secteurs à contamination faible ou nulle (8 prélèvements discordants observés sur les surfaces en zone 1, aucun en zone 3). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces discordances qui associent culture positive et NASBA négative. L'évaluation de la NASBA Panfungi a montré une très bonne sensibilité sur des souches de moisissures de laboratoire (189). Toutefois, les isolats fongiques de l'environnement pourraient présenter certaines différences génomiques avec les souches de laboratoire (mutations au niveau de la zone d'hybridation des amorces) et diminuer cette sensibilité. Afin de vérifier cette hypothèse, des suspensions de spores ont été réalisées à partir des cultures issues de deux de ces prélèvements discordants (positifs en culture, négatifs en biologie moléculaire) puis ces suspensions ont été analysées par NASBA. L'amplification s'est révélée positive pour ces 3 isolats testés, confirmant ainsi la bonne sensibilité de la NASBA Panfungi évaluée préalablement sur des souches de laboratoire (189). Ces discordances observées entre ces deux méthodes pourraient être secondaires à la répartition aléatoire des spores entre les deux échantillonnages (NASBA + culture) d'un même site, en particulier dans les environnements à air maîtrisé où la contamination est très faible. En effet, bien que les surfaces explorées par les deux méthodes (utilisation d'une gélose contact et écouvillonnage) soient contigües, leur colonisation fongique peut différer. Cette hypothèse s'applique également pour les prélèvements d'air, pour lesquels la distance entre les deux impacteurs utilisés pendant l'échantillonnage peut expliquer cette différence de détection. Obligatoire afin de ne pas perturber les flux d'air lors du fonctionnement des impacteurs, cette distance implique que les atmosphères étudiées soient légèrement différentes. Par ailleurs, quel que soit le type de prélèvement, la majorité des discordances (9/17) ont été observées dans les environnements à charge fongique quasi nulle (zone 1 de l'étude) et aucune n'a été constatée dans les secteurs à charge fongique élevée (zone 3 de l'étude). La répartition

aléatoire des spores entre les échantillonnages pourrait donc expliquer la plupart des discordances observées entre ces deux méthodes. Des résultats faussement positifs en culture peuvent également être générés par une contamination accidentelle des milieux gélosés utilisés pour le recueil des spores fongiques. En effet, une contamination de ces milieux lors du transport ou de l'analyse des boîtes de Pétri durant la période d'incubation ne peut être totalement exclue. Néanmoins, le respect des dates de péremption de milieux de culture et l'observation des modes opératoires décrits dans le guide de bonne exécution des analyses du laboratoire de Parasitologie-Mycologie permet de maîtriser et donc de minimiser ce risque (PAM-MYC-MPO-016, PAM-MYC-MPO-017, PAM-MYC-MPO-018, PAM-MYC-MPO-026).

Des discordances inverses, résultant de prélèvements positifs en NASBA mais négatifs en culture ont également été observées dans cette étude et représentent 7,46% (15/201) des prélèvements de surfaces et 5,26% (2/38) des prélèvements d'air. Dans ce cas également, le nombre de discordances observées diminue lorsque la charge fongique augmente (9 prélèvements de surface et 2 prélèvements d'air discordants en zone 1, aucun en zone 3) et ces différences peuvent être très probablement dues à la répartition aléatoire des spores dans les environnements étudiées. Concernant les prélèvements d'air, ces discordances pourraient également résulter des caractéristiques différentes des deux impacteurs utilisés. En effet, bien que la quantité d'air impactée soit identique (1000 L), le temps de recueil est plus long pour l'impacteur MASS (20 minutes) que pour l'impacteur Air Ideal (10 minutes), ce qui augmente la probabilité d'aérosolisation et de recueil d'une spore fongique. Enfin, une contamination du prélèvement traité par la NASBA pourrait être évoquée pour expliquer ces écarts entre les deux méthodes. Néanmoins, le processus de recueil et d'analyse employé permet de maîtriser au maximum ce risque et cette dernière hypothèse semble très peu probable:

- En biologie moléculaire, les prélèvements et le personnel doivent respecter un circuit très strict selon le principe de la « marche en avant », afin d'éviter toute contamination des locaux, des réactifs ou des prélèvements. Au centre Christophe Mérieux, ces procédures sont décrites dans le guide de bonnes pratiques d'utilisation du laboratoire (procédure FDP/2037/151)
- L'emploi de tubes FalconTM hermétiques (ou de dispositifs *peppermill air*) permet de limiter au maximum les contaminations éventuelles du recueil lors du transport avant extraction de l'ARN.

- La phase d'extraction des ARN s'effectue en système clos dans le prototype d'automate POP 1, empêchant toute contamination des extraits.
- L'amplification s'effectue également en système clos (barrettes 8 puits Greiner®). Une contamination inter échantillons par l'opérateur est néanmoins toujours possible lors du dépôt des extraits dans les barrettes. Afin de limiter ce risque de détection faussement positive d'un échantillon par la NASBA, chaque extrait est amplifié en duplicate et seule une répétabilité correcte permet de valider la technique.

L'obtention de résultats positifs en NASBA et négatifs en culture fongique pourrait également traduire une meilleure sensibilité analytique de la biologie moléculaire. En effet, ces moisissures non détectées sur milieu Sabouraud peuvent correspondre à des souches viables mais non cultivables. Cette hypothèse est reprise dans plusieurs études réalisées sur la flore fongique environnementale où l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, en particulier de la PCR, a permis la mise en évidence d'ADN de spores fongique altérées non viables ou de spores provenant de souches non cultivables, potentiellement pathogènes pour l'homme (6,117). De nombreux auteurs considèrent ainsi que le taux évalué par la culture mycologique sous-estime le taux de contamination « réel » d'un environnement et le risque fongique associé (53,117,123,127). Selon les études, ce ratio peut varier entre 2 et 10 (127,198).

La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature est délicate puisqu'à notre connaissance, il n'existe pas de publication traitant de l'évaluation de la contamination fongique globale en environnement protégé par biologie moléculaire. L'utilisation de la PCR pour quantifier l'aéro-biocontamination fongique est décrite dans plusieurs études, mais il s'agit alors principalement d'évaluations réalisées dans des secteurs fortement contaminés, tels que des logements insalubres, des bâtiments en travaux ou des logements agricoles (116,127,198,199). Certains travaux confirment néanmoins l'intérêt de la biologie moléculaire par rapport à la culture dans l'évaluation d'environnements faiblement contaminés en cas de recherche d'un agent pathogène spécifique. Dans une étude portant sur la détection de *Stachybotrys chartarum* par une rt-PCR spécifique, 15 prélèvements d'air et de surfaces ont été réalisés dans des chambres à air maîtrisé du service d'hématologie du CHU de Besançon (200). *S. chartarum* a été isolé en culture dans 2 prélèvements, contre 6 en biologie moléculaire. Dans cette étude, le seuil de détection de la rt-PCR a été estimé à 1 équivalent spore par PCR, seuil assez proche de celui évalué pour la NASBA Panfungi (0,5 équivalent spore par NASBA) (189). Une autre étude portant sur la détection environnementale

spécifique d'*A. fumigatus* par rt-PCR a été réalisée sur des échantillons d'air, provenant de chambres à environnement maîtrisé (filtre HEPA) et des couloirs attenants (65). Les résultats obtenus ici par Bellanger *et al.* confirment également la meilleure sensibilité de la biologie moléculaire par rapport à la culture puisque sur 43 prélèvements réalisés, *A. fumigatus* a été détecté sur 19 échantillons en PCR, contre 7 en culture. Toutefois, cette étude ne distingue pas la contamination des chambres de celle des couloirs de l'unité et ces résultats sont donc difficilement comparables aux nôtres.

Au travers de notre étude, la NASBA Panfungi, par sa bonne concordance avec la culture mycologique (86,57% et 81,58% de concordance, respectivement pour les prélèvements de surfaces et d'air) ainsi que par sa rapidité d'analyse, apparaît comme une technique très intéressante dans l'évaluation de la contamination fongique environnementale. De plus, sa très bonne sensibilité analytique lui permettrait de pallier aux limites de la culture, en particulier par la détection de particules non cultivables. En outre, contrairement aux méthodes PCR, la NASBA Panfungi ne détecterait théoriquement que les particules fongiques viables. En effet, la plupart des méthodes PCR développées dans le domaine de l'évaluation de la contamination environnementale reposent sur la détection de fragments d'ADN, qui peuvent subsister longtemps après la mort de la cellule fongique (51,115,121,125). Ces techniques pouvant surestimer l'exposition fongique réelle, elles sont peu adaptées aux environnements à charge fongique faible. À l'inverse, les molécules d'ARN étant dégradées rapidement après la mort cellulaire, leur détection par NASBA constituerait un bon indicateur de la contamination fongique réelle d'un milieu (177–179).

Il convient toutefois d'apporter quelques nuances à ces constatations. Tout d'abord, l'une des limites de cette étude est l'absence de méthode de référence fiable permettant d'évaluer très précisément la charge fongique d'un environnement. En effet, les résultats de la NASBA sont confrontés ici à une méthode de sensibilité modérée: la culture fongique sur milieu Sabouraud. De plus, la robustesse de la méthode NASBA Panfungi pourrait encore être optimisée puisque plusieurs prélèvements ont nécessité une seconde amplification pour cause de résultats non interprétables. Sur l'ensemble de l'étude, 13,6% des échantillons (34/250) ont nécessité une seconde amplification par NASBA (résultat non interprétable après une amplification) et 3,6% ont dû être exclus de l'analyse des résultats (5 prélèvements de surfaces et 4 prélèvements d'air, non interprétables après une seconde amplification). Ces résultats non interprétables étaient dus à une absence d'amplification du contrôle interne (n=9) ou à une discordance entre les deux duplicats amplifiés simultanément pour un même

échantillon (n=25). Les discordances observées entre deux duplicates peuvent être secondaires à une contamination d'un puits réactionnel (lors du dépôt des extraits au cours de la phase préparatoire à l'amplification) ou à une inhibition d'amplification d'un duplicate. A notre avis, la présence de composés inhibiteurs, fréquente lors de prélèvements environnementaux, peut également expliquer l'absence d'amplification du contrôle interne dans certains échantillons. La phase d'extraction et de purification des ARN constitue en effet une étape critique avant l'amplification par NASBA. Au cours de cette étape, certains composés (résidus de silice micronisée, séquences nucléotidiques, voire des résidus de détergents présents sur les surfaces...) pourraient inhiber l'amplification des ARN extraits.

Un objectif secondaire de l'étude était de comparer la charge fongique obtenue par la NASBA Panfungi (en Geq) à celle obtenue par la culture (en UFC). Le dénombrement des colonies fongiques n'étant pas réalisable sur les milieux de culture des prélèvements réalisés en secteur fortement contaminé, les prélèvements réalisés en zone 3 n'ont pas été inclus dans cette analyse. Ce dénombrement pourrait en revanche être effectué en utilisant un milieu de culture plus adapté aux environnements à charge fongique élevée, comme le milieu dichloran glycérol 18 (DG 18) (103). Dans les secteurs stériles ou faiblement contaminés (zones de prélèvements 1 et 2), les taux d'ARN ribosomiques évalués par la NASBA sur les prélèvements de surfaces positifs (4,72 +/- 4,49 Geq /25cm² sur 12 prélèvements en zone 1 et 2,93 +/- 2,09 Geq /25cm² sur 13 prélèvements en zone 2) semblent proportionnels à ceux observés en culture (3,09 +/- 4,44 UFC /25 cm² sur 11 prélèvements en zone 1 et 2,45 +/- 3,39 UFC /25 cm² sur 11 prélèvements en zone 2). Cette tendance apparaît moins clairement pour les prélèvements d'air. Toutefois, le nombre d'échantillons évalués étant trop faible et donc les écarts types importants, il n'a pas été possible de réaliser une véritable analyse statistique de corrélation. Cette observation nécessiterait d'être évaluée plus spécifiquement dans une autre étude. Une comparaison quantitative entre la NASBA Panfungi et la culture mycologique pourrait en effet être réalisée sur une gamme de suspensions de spores fongiques de différentes concentrations. Chaque point de cette gamme seraitensemencé et parallèlement extrait puis amplifié par NASBA. Le signal (en Geq /ml) correspondant serait alors rapporté à chaque concentration (en spores /ml). Il n'est néanmoins pas certain qu'une correspondance entre les deux quantifications (par la NASBA Panfungi et par la culture) puisse être établie formellement. En effet, la quantité d'ARN ribosomique exprimée par un isolat fongique peut varier fortement selon l'espèce considérée et l'environnement auquel il est exposé (température, humidité, agression chimique par les produits d'entretien...) (201,202).

Actuellement, bien que la technique NASBA ne permette pas une évaluation quantitative du nombre précis de spores fongiques dans un environnement, cette étude montre que les taux d'ARNr 28S sont significativement plus élevés dans les environnements à charge fongique forte que dans les autres secteurs. Ces résultats sont donc conformes aux attentes: un taux d'ARNr 28S élevé correspondrait à une charge fongique forte, alors qu'un taux plus faible serait observé dans un secteur moins exposé à la contamination. Toutefois quelles seraient les mesures à prendre en cas de détection d'ARN ribosomique fongique en environnement protégé? En hygiène hospitalière, la mise en évidence par la culture de spores fongiques fait l'objet de recommandations précises, encadrées par des textes normatifs, en fonction du secteur contrôlé (classification ISO), de la charge fongique et de l'espèce observée. A notre connaissance, aucune relation n'a été encore établie entre la charge génomique environnementale et le risque de survenue d'une infection fongique invasive. Des travaux seront donc nécessaires afin d'établir dans les environnements étudiés de nouveaux niveaux de qualité: seuils cible, d'action et d'alerte.

En parallèle, cette étude permet également d'avoir une évaluation de la contamination d'un secteur protégé, classé au minimum ISO 7 selon les directives de la norme ISO 14644-1 (67). Le risque infectieux correspondant à cette zone est élevé et la contamination fongique environnementale attendue dans ce secteur est donc nulle. Le seuil recommandé est une contamination inférieure à 1 UFC de champignon filamenteux par gélose contact pour les surfaces et inférieure à 1 UFC de champignon filamenteux par m³ d'air (100,192). Dans notre étude, les taux de contamination fongiques retrouvés dans les chambres d'isolement d'hématologie sur certains prélèvements de surface ou d'air sont supérieurs à ces directives. En effet, afin de perturber le moins possible les patients hospitalisés, la plupart des prélèvements ont été réalisés dans la chambre n°1 de l'unité d'hématologie du CHU de Grenoble, qui était inoccupée au moment de l'étude. Le système de filtration de l'air de cette chambre (filtre HEPA) devant être révisé durant cette période, cette chambre n'était pas considérée comme stérile (classée ISO 7). Cette particularité par rapport aux autres chambres de l'unité (qui ne modifie pas les objectifs de notre étude) peut expliquer ces taux de contamination fongique plus élevés que prévus. Comme attendu, un gradient de contamination fongique est observé entre les trois zones étudiées. Cette constatation avait déjà été mise en évidence par plusieurs auteurs et confirme l'efficacité des mesures mises en œuvre pour limiter et contrôler la contamination fongique dans les secteurs à environnement protégé (15,71,72,203,204). L'observation des cultures fongiques dans les zones peu ou pas

contaminées (zones 1 et 2) montre une majorité d'isolats de *Penicillium* sp et de *Cladosporium* sp. Cette observation est cohérente avec celles rapportées dans plusieurs études réalisées sur la contamination de l'air intérieur des secteurs protégés en milieu hospitalier français, qui montraient une prédominance des mêmes genres de moisissures (*Penicillium* sp: 23-28% et *Cladosporium* sp: 15-16%) (12,57). De plus, nous observons que pour une zone donnée, le taux de contamination de l'air peut être très différent de celui des surfaces avoisinantes. Ce phénomène peut s'expliquer par l'aérosolisation variable des spores fongiques, selon l'espèce et les conditions environnementales (température, humidité, flux d'air) (1,5,14,27,30,37). Cette constatation a été rapportée dans plusieurs études et confirme l'intérêt d'évaluer les deux milieux en parallèle (15,205).

A l'issue de cette étude, la NASBA Panfungi nous apparaît comme une technique prometteuse dans l'évaluation de la charge fongique des environnements à contamination faible. Plus rapide que la culture mycologique, cette méthode permettrait une mise en place précoce d'actions curatives en cas de contamination avérée d'un secteur. De plus, sa spécificité, sa bonne sensibilité et la capacité de mise en évidence de champignons viables non cultivables permettraient une détection plus précise de la charge fongique « réelle » (117). Compte tenu du faible nombre de prélèvements positifs obtenus (ce qui est cohérent avec une évaluation d'un secteur à air maîtrisé), il n'a pas été possible d'établir dans cette étude une relation entre la quantité d'ARN fongique (exprimée en Geq) et le nombre de spores présentes dans l'environnement (exprimé en UFC). Cette problématique, qui ne correspondait pas à notre objectif initial, devra donc être évaluée par une nouvelle étude. Le développement de la NASBA Panfungi ouvrirait des perspectives dans de nombreux domaines où la qualité et la maîtrise de l'air et des surfaces constituent une nécessité: secteur hospitalier et aérospatial bien sur, mais également industriel ou agroalimentaire. Dans ces secteurs d'activité cette maîtrise peut se révéler indispensable pour la santé humaine mais également dans une démarche d'assurance qualité, en vue d'une certification ou d'une accréditation.

THESE SOUTENUE PAR: Mr Thomas BERENDSEN

TITRE : Comparaison de la NASBA Panfungi à la culture mycologique pour la détection de la contamination fongique d'un environnement à air maîtrisé

Conclusion

L'air et les surfaces d'un environnement sont naturellement contaminés par des micro-organismes: bactéries, levures, champignons filamenteux... Organismes eucaryotes ubiquitaires, les spores fongiques peuvent rester en suspension dans l'air ou sédimer sur les surfaces. En secteur hospitalier, cette contamination fongique environnementale peut être responsable d'infections fongiques invasives nosocomiales. Dans le domaine de l'aérospatial, elle constitue un risque écologique et sanitaire, compte tenu de l'immunodépression induite par les vols spatiaux. La maîtrise de l'environnement est nécessaire dans ces secteurs et requiert une détection rapide et sensible de la flore fongique.

Le projet MiDASS a pour objectif de répondre à cette problématique par la mise au point d'une plateforme miniaturisée capable de détecter par biologie moléculaire les champignons et bactéries de l'air et des surfaces. La NASBA Panfungi développée dans le cadre de cette collaboration entre l'Agence Spatiale Européenne et bioMérieux est une technologie de détection rapide et exhaustive de l'ARNr 28S, témoin de la présence de spores fongiques. La sensibilité et la spécificité de la NASBA Panfungi avaient déjà été évaluées sur des souches fongiques sélectionnées, mais les performances de cette méthode restaient à étudier dans le domaine environnemental.

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer les performances de la NASBA Panfungi par rapport à la culture mycologique en environnement très faiblement contaminé. Dans le cadre de ce travail, 206 prélèvements de surfaces et 44 prélèvements d'air, répartis sur respectivement douze et onze campagnes ont été réalisés dans trois secteurs d'une unité d'hématologie du CHU de Grenoble, comprenant un secteur à air maîtrisé et correspondant à trois niveaux de contamination fongique différents. Chaque point de prélèvement a été contrôlé en parallèle par la NASBA et la culture.

L'évaluation de la NASBA Panfungi par rapport à la culture mycologique traditionnelle sur les prélèvements de surfaces a montré une concordance globale de 86,57% (174/201). L'agrément entre les deux méthodes est ici considéré comme fort, avec un coefficient Kappa ajusté à la prévalence de 73,1%. Sur les prélèvements d'air, cette concordance a été évaluée à 81,58% (31/38). Le degré d'accord est également considéré fort, avec un coefficient Kappa ajusté à la prévalence de 63,4%.

Certaines discordances ont été observées entre les deux méthodes et concernent principalement les zones à charge fongique quasi nulle. Ces écarts constatés entre les deux méthodes semblent dus à la répartition aléatoire des spores fongiques dans les environnements étudiés. De plus, la très bonne sensibilité analytique de la NASBA Panfungi et sa capacité à détecter des éléments fongiques non ou difficilement cultivables pourrait expliquer que plusieurs prélèvements (7,46% des prélèvements de surfaces et 5,26% des prélèvements d'air) aient été considérés positifs par la NASBA et négatifs par la culture mycologique.

Il n'a pas été possible dans cette étude d'établir significativement une corrélation quantitative entre le taux d'ARNr 28S évalué par la NASBA et le nombre de colonies fongiques obtenu par la culture mycologique. En effet, le nombre d'échantillons positifs collectés lors de cette évaluation réalisée en environnement à air maîtrisé était trop faible pour une véritable étude statistique. Cette question ne constituait cependant pas l'objectif principal de notre travail.

L'apport de la NASBA Panfungi ouvre de nombreuses perspectives dans le domaine de l'évaluation de la contamination fongique des environnements à air maîtrisé. Outre les secteurs hospitaliers et aérospatiaux, sa sensibilité et sa rapidité d'analyse pourraient permettre son adaptation dans d'autres domaines où la maîtrise de la contamination microbienne environnementale est nécessaire, en particulier les secteurs pharmaceutiques, industriels et agroalimentaires. Cependant, une évaluation complémentaire de faisabilité et de coût est nécessaire afin de démontrer la compatibilité de cette technique avec les contraintes économiques liées à un système de surveillance à grande échelle.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LE DOYEN,

Professeur Christophe Ribuot



Grenoble, le 7/02/14

LE PRESIDENT DE LA THESE,

Professeur Muriel Cornet

A handwritten signature in black ink.

Références bibliographiques

1. Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Groupe de travail « Moisissures dans l'habitat ». Contaminations fongiques en milieux intérieurs: diagnostic, effets sur la santé respiratoire, conduites à tenir. Paris, 2006.
2. Pasanen A. A review: fungal exposure assessment in indoor environments. *Indoor Air*. 2001; **11**: 87-98.
3. Bardana E Jr. Indoor air quality and health does fungal contamination play a significant role? *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003; **23**: 291-309.
4. Host S, Lefranc A, Camard JP, Chardon B, Gremy I. Pollution de l'air intérieur. État des connaissances concernant les effets sanitaires et faisabilité d'une étude épidémiologique en Ile-de-France. ORS Ile-de-France, 2005.
5. Méheust D. Exposition aux moisissures en environnement intérieur: méthodes de mesure et impacts sur la santé [thèse]. Rennes: Université Rennes 1; 2012.
6. Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, Grenouillet F, Millon L. Moisissures et habitat: risques pour la santé et espèces impliquées. *Rev Fr Allergol*. 2010; **50**: 611-620.
7. Alberti C, Bouakline A, Ribaud P, Lacroix C, Rousselot P, Leblanc T, *et al*. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *J Hosp Infect*. 2001; **48**: 198-206.
8. Robbins CA, Swenson LJ, Nealley ML, Gots RE, Kelman BJ. Health effects of mycotoxins in indoor air: a critical review. *Appl Occup Environ Hyg*. 2000; **15**: 773-784.
9. Brenier-Pinchart MP, Lebeau B, Borel JL, Quesada JL, Mallaret MR, Garban F, *et al*. Community-acquired invasive aspergillosis and outdoor filamentous fungal spore load: a relationship? *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; **17**: 1387-1390.
10. Bloom E, Nyman E, Must A, Pehrson C, Larsson L. Molds and mycotoxins in indoor environments--a survey in water-damaged buildings. *J Occup Environ Hyg*. 2009; **6**: 671-678.
11. Shelton BG, Kirkland KH, Flanders WD, Morris GK. Profiles of Airborne Fungi in Buildings and Outdoor Environments in the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2002; **68**: 1743-1753.
12. Sautour M, Sixt N, Dalle F, L'Ollivier C, Fourquenot V, Calinon C, *et al*. Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci Total Environ*. 2009; **407**: 3766-3771.

13. Eduard W. Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit Rev Toxicol*. 2009; **39**: 799.
14. Buttner MP, Stetzenbach LD. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl Environ Microbiol*. 1993; **59**: 219-226.
15. Brenier-Pinchart MP, Lebeau B, Quesada JL. Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. *Am J Infect Control*. 2009; **37**: 631-637.
16. Risque infectieux fongique et travaux en établissements de santé. Identification du risque et mise en place de mesures de gestion. Hygiènes vol. 19. Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H): Paris; 2011.
17. Gots RE, Layton NJ, Pirages SW. Indoor health: background levels of fungi. *AIHA Journal*. 2003; **4**: 427-438.
18. Nicolle MC, Lebeau B, Perraud M, Berthelot P, Gari-Toussaint M, Raberin H, *et al*. Surveillance de l'environnement fongique en hématologie: Analyse des pratiques de neuf centres hospitaliers et élaboration d'un protocole commun. *J Mycol Med*. 2002; **12**: 12-20.
19. Gangneux JP, Bousseau A, Cornillet A, Kauffmann-Lacroix C. Maîtrise du risque fongique environnemental dans les établissements de santé. *J Mycol Med*. 2006; **16**: 204-211.
20. Sonnenfeld G, Butel JS, Shearer WT. Effects of the space flight environment on the immune system. *Rev Environ Health*. 2003; **18**: 1-17.
21. Fitzgerald W, Chen S, Walz C, Zimmerberg J, Margolis L, Grivel JC. Immune suppression of human lymphoid tissues and cells in rotating suspension culture and onboard the International Space Station. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2009; **45**: 622-632.
22. Crucian BE, Stowe RP, Pierson DL, Sams CF. Immune system dysregulation following short-vs long-duration spaceflight. *Aviat Space Environ Med*. 2008; **79**: 835-843.
23. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel. *Nutrition*. 2002; **18**: 889-898.
24. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991; **350**: 91-92.
25. Duquenne P, Greff- Mirguet G. L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens. *Hygiène et Sécurité du Travail. Cahiers de notes documentaires*. 2005, ND 2222-198-05, 23-8.

26. Stetzenbach LD, Buttner MP, Cruz P. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Opin Biotechnol.* 2004; **15**: 170-174.
27. Srikanth P, Sudharsanam S, Steinberg R. Bio-aerosols in indoor environment: Composition, health effects and analysis. *Indian J Med Microbiol.* 2008; **26**: 302-312.
28. Bellanger AP, Reboux G, Roussel S, Grenouillet F, Didier-Scherer E, Dalphin JC, *et al.* Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.* 2009; **49**: 260-266.
29. Goyer N, Lavoie J, Lazure L, Marchand G. Les bioaérosols en milieu de travail: guide d'évaluation, de contrôle et de prévention. Guide technique études et recherches. Montréal, 2001.
30. Cahier de formation biologie médicale n°25. Les moisissures d'intérêt médical. Bioforma. Paris, 2002.
31. Hyvärinen A, Meklin T, Vepsäläinen A, Nevalainen A. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials - concentrations and diversity. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2002; **49**: 27-37.
32. McNeil MM, Brown JM. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 1994; **7**: 357-417.
33. Nilsson S, Käärik A, Keller J, Kiffer E, Perreau J, Reisinger O. Atlas of airborne fungal spores in Europe. Springer-Verlag: Berlin; 1983.
34. Lejeune B. Biocontamination et contrôle de l'environnement hospitalier. Société française d'hygiène hospitalière (SF2H). Paris; 2008.
35. Muñoz P, Burillo A, Bouza E. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2001; **7**: 38-45.
36. ANOFEL. Aspergilloses. UMVF. Campus de Parasitologie Mycologie. Campus numérique. France ; 2009.
37. Morin O. Aspergillus et aspergillose : biologie. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses*, 8-600-A-10; 2003.
38. Verhoeff AP, Burge HA. Health risk assessment of fungi in home environments. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol.* 1997; **78**: 544-556.
39. Ljungqvist B, Reinmüller B. Airborne viable particles and total number of airborne particles: comparative studies of active air sampling. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2000; **54**: 112-116.

40. Vescia N, Brenier-Pinchart MP, Osborn JF, Cerquetani F, Cavarischia R, Grillot R, *et al.* Field validation of a dusting cloth for mycological surveillance of surfaces. *Am J Infect Control.* 2011; **39**: 156-158.
41. Zeng QY, Westermarck SO, Rasmuson-Lestander A, Wang XR. Detection and quantification of *Cladosporium* in aerosols by real-time PCR. *J Environ Monit.* 2006; **8**: 153-160.
42. Duong TA. Infection due to *Penicillium marneffei*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clin Infect Dis.* 1996; **23**:125-130.
43. Nong S, Liang J. Bone marrow *Penicillium marneffei* infection in acquired immunodeficiency syndrome patients: report of 35 cases. *Trop Biomed.* 2013; **30**: 89-91.
44. Ranjana KH, Priyokumar K, Singh TJ, Gupta CC, Sharmila L, Singh PN, *et al.* Disseminated *Penicillium marneffei* infection among HIV-infected patients in Manipur state, India. *J Infect.* 2002; **45**: 268-271.
45. Recommandations de l'Association pour la Prévention et l'Etude de la Contamination (ASPEC). Etablissements de santé. Contrôles de l'environnement dans les zones à hauts risques et très hauts risques infectieux. 1999.
46. Blum G, Perkhofer S, Grif K, Mayr A, Kropshofer G, Nachbaur D, *et al.* A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2008; **14**: 1146-51.
47. Thompson GR. Pulmonary aspergillosis: recent advances. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011; **32**: 673-81.
48. Leenders AC, van Belkum A, Behrendt M, Luijendijk A, Verbrugh HA. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol.* 1999; **37**: 1752-1757.
49. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, *et al.* A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012; **54**: 35-43.
50. Skiada A, Pagano L, Groll A, Zimmerli S, Dupont B, Lagrou K, *et al.* Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect.* 2011; **17**: 1859-1867.
51. Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg.* 2003; **47**: 187-200.
52. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996; **9**: 499-511.

53. Niemeier RT, Sivasubramani SK, Reponen T, Grinshpun SA. Assessment of fungal contamination in moldy homes: comparison of different methods. *J Occup Environ Hyg.* 2006; **3**: 262-273.
54. Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M, Hiemenz JW, Wingard JR, Dupont B, *et al.* Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices, and outcomes. I3 Aspergillus Study Group. *Medicine.* 2000; **79**: 250-260.
55. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs.* 2007; **67**: 1567-1601.
56. Gangneux JP, Drogoul AS. Infections fongiques invasives: nouvelles données épidémiologiques et écologiques. *Hématologie.* 2008; **14**: 5-11.
57. Faure O, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Mallaret MR, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Eight-year surveillance of environmental fungal contamination in hospital operating rooms and haematological units. *J Hosp Infect.* 2002; **50**: 155-160.
58. Kume H, Yamazaki T, Abe M, Tanuma H, Okudaira M, Okayasu I. Epidemiology of visceral mycoses in patients with leukemia and MDS - Analysis of the data in annual of pathological autopsy cases in Japan in 1989, 1993, 1997 and 2001. *Jpn J Med Mycol.* 2006; **47**: 15-24.
59. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, *et al.* Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007): Invasive aspergillosis surveillance. *Clin Microbiol Infect.* 2011; **17**: 1882-1889.
60. Parameswaran GI, Segal BH, Almyroudis NG. Antifungal agents in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des.* 2008; **14**: 2011-2021.
61. Pini G, Donato R, Faggi E, Fanci R. Two years of a fungal aerobiocontamination survey in a Florentine haematology ward. *Eur J Epidemiol.* 2004; **19**: 693-698.
62. Yamazaki T, Kume H, Murase S, Yamashita E, Arisawa M. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol.* 1999; **37**: 1732-1738.
63. CEA web site. Consulté le 29 janvier 2013.
<<http://www.cea.fr>>
64. Alloul-Marmor L. État de l'art sur les émissions particulières du personnel. Salles Propres n°41. Association pour la Prévention et l'Etude de la Contamination (ASPEC). 2005.
65. Bellanger AP, Reboux G, Murat JB, Bex V, Millon L. Detection of *Aspergillus fumigatus* by quantitative polymerase chain reaction in air samples impacted on low-melt agar. *Am J Infect Control.* 2010; **38**: 195-198.

66. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, *et al.* Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* 1997; **35**: 1353-1360.
67. Perlin DS, Zhao Y. Molecular diagnostic platforms for detecting *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2009; **47**: 223-232.
68. Crimi P, Valgiusti M, Macrina G, Grieco A, Massone L, Ciucci A, *et al.* Evaluation of microbial contamination of air in two haematology departments equipped with ventilation systems with different filtration devices. *J Prev Med Hyg.* 2009; **50**: 33-36.
69. Fung F, Hughson WG. Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl Occup Environ Hyg.* 2003; **18**: 535-544.
70. Fournieret-Vivier A, Lebeau B, Mallaret MR, Brenier-Pinchart MP, Brion JP, Pinel C, *et al.* Hospital-wide prospective mandatory surveillance of invasive aspergillosis in a French teaching hospital (2000-2002). *J Hosp Infect.* 2006; **62**: 22-28.
71. Brocard-Lemort C. Normes et recommandations en hygiène environnementale hospitalière. *Ann Biol Clin.* 2000; **58**: 431-437.
72. Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES) et Société Française d'Hygiène Hospitalière. Conférence de consensus: Prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés (Hématologie, Transplantation). Institut Pasteur, Paris, 2000.
73. Garnaud C, Brenier-Pinchart MP, Thiebaut-Bertrand A, Hamidfar R, Quesada JL, Bosseray A, *et al.* Seven-year surveillance of nosocomial invasive aspergillosis in a French University Hospital. *J Infect.* 2012; **65**: 559-567.
74. Norme NF EN ISO 14698: Salles propres et environnement maîtrisés apparentés. Maîtrise de la biocontamination.
75. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN & Cavallo J. Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé. Air, eaux et surfaces. 2002: 77.
76. Bailey KL, Meza JL, Smith LM, Von Essen SG, Romberger DJ. Agricultural exposures in patients with COPD in health systems serving rural areas. *J Agromedicine.* 2007; **12**: 71-76.
77. Jouneau S, Boché A, Brinchault G, Fekete K, Guillot S, Bayat S, *et al.* On-site screening of farming-induced chronic obstructive pulmonary disease with the use of an electronic mini-spirometer: results of a pilot study in Brittany, France. *Int Arch Occup Environ Health.* 2012; **85**: 623-630.
78. Dalphin JC. Bronchopneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) d'origine professionnelle. *Rev Mal Respir.* 2001; **18**: 581-583.

79. Roussel S, Reboux G, Piarroux R, Dalphin JC. Les actualités sur les pneumopathies d'hypersensibilité en milieu rural. *Rev Fr Allergol*. 2005; **45**: 183-188.
80. Reboux G, Roussel S, Grenouillet F. Moisissures de l'environnement agricole. *J Mycol Med*. 2006; **16**: 248-262.
81. Mendell MJ, Mirer AG, Cheung K, Tong M, Douwes J. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect*. 2011; **119**: 748-756.
82. Fisk WJ, Lei-Gomez Q, Mendell MJ. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air*. 2007; **17**: 284-296.
83. Peat JK, Dickerson J, Li J. Effects of damp and mould in the home on respiratory health: a review of the literature. *Allergy*. 1998; **53**: 120-128.
84. Bornehag CG, Blomquist G, Gyntelberg F, Järholm B, Malmberg P, Nordvall L, *et al*. Dampness in buildings and health. Nordic interdisciplinary review of the scientific evidence on associations between exposure to « dampness » in buildings and health effects. *Indoor Air*. 2001; **11**: 72-86.
85. Polizzi V, Delmulle B, Adams A, Moretti A, Susca A, Picco AM, *et al*. JEM Spotlight: Fungi, mycotoxins and microbial volatile organic compounds in mouldy interiors from water-damaged buildings. *J Environ Monit*. 2009; **11**: 1849-1858.
86. Khan ZU, Ahmad S, Theyyathel AM. Diagnostic value of DNA and (1→3)-β-d-glucan detection in serum and bronchoalveolar lavage of mice experimentally infected with *Fusarium oxysporum*. *J Med Microbiol*. 2008; **57**: 36-42.
87. O'Hollaren MT, Yunginger JW, Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ, *et al*. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *N Engl J Med*. 1991; **324**: 359-363.
88. Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ*. 2002; **25**: 411-414.
89. Association française des enseignants de parasitologie. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. 2è édition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2010. 245-256.
90. Madsen AM, Tendal K, Schlünssen V, Heltberg I. Organic dust toxic syndrome at a grass seed plant caused by exposure to high concentrations of bioaerosols. *Ann Occup Hyg*. 2012; **56**: 776-788.
91. Rylander R, Norrhall M, Engdahl U, Tunsäter A, Holt PG. Airways inflammation, atopy, and (1→3)-beta-D-glucan exposures in two schools. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; **158**: 1685-1687.

92. Bush RK, Portnoy JM, Saxon A, Terr AI, Wood RA. The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; **117**: 326-333.
93. Janson C, Anto J, Burney P, Chinn S, de Marco R, Heinrich J, *et al*. The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? European Community Respiratory Health Survey II. *Eur Respir J*. 2001; **18**: 598-611.
94. Macher J. Bioaerosols: assessment and control. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 1999.
95. Araki A, Eitaki Y, Kawai T, Kanazawa A, Takeda M, Kishi R. Diffusive sampling and measurement of microbial volatile organic compounds in indoor air. *Indoor Air*. 2009; **19**: 421-432.
96. Elke K, Begerow J, Oppermann H, Krämer U, Jermann E, Dunemann L. Determination of selected microbial volatile organic compounds by diffusive sampling and dual-column capillary GC-FID--a new feasible approach for the detection of an exposure to indoor mould fungi? *J Environ Monit*. 1999; **1**: 445-452.
97. Rose LJ, Simmons RB, Crow SA, Ahearn DG. Volatile organic compounds associated with microbial growth in automobile air conditioning systems. *Curr Microbiol*. 2000; **41**: 206-209.
98. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; **348**: 1546-1554.
99. Germaud P. « Aspergillus » et système respiratoire. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Traité de Médecine Akos*, 6-0925, 2005.
100. Guide des bonnes pratiques en hygiène hospitalière. Mesures et contrôles de la qualité de l'air des salles propres. France Air, 2001.
101. Centre scientifique et technique du bâtiment. Synthèse bibliographique sur les méthodes de mesure de légionellose. Marne La vallée Rapport, 2006. Rapport n° DDD/ SB/ 11.
102. Ministère chargé de la santé, DGS/DHOS, CTIN. 100 recommandations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. 1999.
103. Wu PC, Su HJ, Ho HM. A comparison of sampling media for environmental viable fungi collected in a hospital environment. *Environ Res*. 2000; **82**: 253-257.
104. Trudeau WL 3rd, Fernández-Caldas E. Identifying and measuring indoor biologic agents. *J Allergy Clin Immunol*. 1994; **94**: 393-400.
105. Vanhee LME, Nelis HJ, Coenye T. Rapid detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples using solid-phase cytometry. *Environ Sci Technol*. 2009; **43**: 3233-3239.

106. Godish D, Godish T. Total Airborne Mold Particle Sampling: Evaluation of sample collection, preparation and counting procedures, and collection devices. *J Occup Environ Hyg.* 2007, **5**: 100-106.
107. Smith R, von Tress M, Tubb C, Vanhaecke E. Evaluation of the ScanRDI(R) as a rapid alternative to the pharmacopoeial sterility test method: comparison of the limits of detection. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2010;**64**: 356-363.
108. Méheust D, Le Cann P, Gangneux JP. Rapid quantification of viable fungi in hospital environments: analysis of air and surface samples using solid-phase cytometry. *J Hosp Infect.* 2013; **83**: 122-126.
109. Vanhee LME, Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Nelis HJ, Coenye T. Rapid and direct quantification of viable *Candida* species in whole blood by use of immunomagnetic separation and solid-phase cytometry. *J Clin Microbiol.* 2010; **48**: 1126-1131.
110. BioMérieux web site. Consulté le 28 octobre 2013.
<<http://www.biomerieux.com/fr/cytometrie>>
111. Prigione V, Lingua G, Marchisio VF. Development and use of flow cytometry for detection of airborne fungi. *Appl Environ Microbiol.* 2004; **70**: 1360-1365.
112. Alvarez AJ, Buttner MP, Stetzenbach LD. PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference. *Appl Environ Microbiol.* 1995; **61**: 3639-3644.
113. Cai GH, Bröms K, Mälarstig B, Zhao ZH, Kim JL, Svärdsudd K, *et al.* Quantitative PCR analysis of fungal DNA in Swedish day care centers and comparison with building characteristics and allergen levels. *Indoor Air.* 2009; **19**: 392-400.
114. Wu Z, Blomquist G, Westermark SO, Wang XR. Application of PCR and probe hybridization techniques in detection of airborne fungal spores in environmental samples. *J Environ Monit.* 2002; **4**: 673-678.
115. Williams RH, Ward E, McCartney HA. Methods for integrated air sampling and DNA analysis for detection of airborne fungal spores. *Appl Environ Microbiol.* 2001; **67**: 2453-2459.
116. Zeng QY, Westermark SO, Rasmuson-Lestander A, Wang XR. Detection and quantification of *Wallemia sebi* in aerosols by real-time PCR, conventional PCR, and cultivation. *Appl Environ Microbiol.* 2004; **70**: 7295-7302.
117. Pitkäranta M, Meklin T, Hyvärinen A, Paulin L, Auvinen P, Nevalainen A, *et al.* Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Appl Environ Microbiol.* 2008; **74**: 233-244.
118. Morrison J, Yang C, Lin K-T, Haugland RA, Neely AN, Vesper SJ. Monitoring *Aspergillus* species by quantitative PCR during construction of a multi-storey hospital building. *J Hosp Infect.* 2004; **57**: 85-87.

119. McDevitt JJ, Lees PSJ, Merz WG, Schwab KJ. Development of a method to detect and quantify *Aspergillus fumigatus* conidia by quantitative PCR for environmental air samples. *Mycopathologia*. 2004; **158**: 325-335.
120. Vesper SJ, Haugland RA, Rogers ME, Neely AN. Opportunistic *Aspergillus* pathogens measured in home and hospital tap water by quantitative PCR (QPCR). *J Water Health*. 2007; **5**: 427-431.
121. Oppliger A, Masclaux FG, Niculita-Hirzel H. Assessment of airborne microorganisms by real-time PCR: optimistic findings and research challenges. *Front Biosci Sch Ed*. 2011; **3**: 445-453.
122. Millon L, Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, Sornin S, Martin C, *et al.* Quantification de *Stachybotrys chartarum* par PCR en temps réel dans l'environnement domestique, hospitalier, et agricole. *J Mycol Med*. 2006; **16**: 183-188.
123. Lignell U, Meklin T, Rintala H, Hyvärinen A, Vepsäläinen A, Pekkanen J, *et al.* Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. *Lett Appl Microbiol*. 2008; **47**: 303-308.
124. Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper S. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol*. 2004; **27**: 198-210.
125. Vesper S, Wakefield J, Ashley P, Cox D, Dewalt G, Friedman W. Geographic distribution of Environmental Relative Moldiness Index molds in USA homes. *J Environ Public Health*. **2011**, 2011: 242457.
126. Vesper S, McKinstry C, Haugland R, Neas L, Hudgens E, Heidenfelder B, *et al.* Higher Environmental Relative Moldiness Index (ERMIsm) values measured in Detroit homes of severely asthmatic children. *Sci Total Environ*. 2008; **394**: 192-196.
127. Meklin T, Haugland RA, Reponen T, Varma M, Lummus Z, Bernstein D, *et al.* Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal mold conditions. *J Environ Monit*. 2004; **6**: 615-620.
128. Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K, Jairus T, Sadam A, Saar I, *et al.* 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol*. 2010; **188**: 291-301.
129. Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; **87**: 99-108.
130. Peccia J, Hospodsky D, Bibby K. New Directions: A revolution in DNA sequencing now allows for the meaningful integration of biology with aerosol science. *Atmos Environ*. 2011; **45**: 1896-1897.

131. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010; **11**: 31-46.
132. Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L, Bardonnet K, *et al.* Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; **163**: 1534-1539.
133. Huard M, Barrette MC, Lesage J. Dosage de composés organiques volatils dans l'air par spectrométrie de masse. Méthodes analytiques. Montréal, IRSST; 2012.
134. Matcham SE, Jordan BR, Wood DA. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1985; **21**: 108-112.
135. Robine E, Lacaze I, Moularat S, Ritoux S, Boissier M. Characterisation of exposure to airborne fungi: measurement of ergosterol. *J Microbiol Methods.* 2005; **63**: 185-192.
136. Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, *et al.* Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol.* 2000; **66**: 1899-1904.
137. Li S, Marquardt RR, Abramson D. Immunochemical detection of molds: a review. *J Food Prot.* 2000; **63**: 281-291.
138. Green BJ, Tovey ER, Beezhold DH, Perzanowski MS, Acosta LM, Divjan AI, *et al.* Surveillance of fungal allergic sensitization using the fluorescent halogen immunoassay. *J Mycol Med.* 2009; **19**: 253-261.
139. Simpkins SA, Chan AB, Hays J, Öpping BP, Cook N. An RNA transcription-based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*. *Lett Appl Microbiol.* 2000; **30**: 75-79.
140. Zhao Y, Perlin DS. Quantitative Detection of *Aspergillus* spp by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013; **968**: 83-92.
141. Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol Biotechnol.* 2002; **20**: 163-179.
142. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; **28**: 495-503.
143. Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Paris: Elsevier Masson; 2005.
144. Monis PT, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2006; **6**: 2-12.

145. BioMérieux web site. Consulté le 12 avril 2013.
<<http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/home>>
146. Rodriguez-Lazaro D, D'Agostino M, Pla M, Cook N. Construction strategy for an internal amplification control for real-time diagnostic assays using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification: Development and Clinical Application. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 5832-5836.
147. Collot S, Alain S, Denis F, Ranger-Rogez S. Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Virologie.* 2002; **5**: 439-48.
148. Weusten JJ, Carpay WM, Oosterlaken TA, van Zuijlen MC, van de Wiel PA. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. *Nucleic Acids Res.* 2002; **30**: e26.
149. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med.* 2003; **9**: 189-195.
150. Abravaya K, Huff J, Marshall R, Merchant B, Mullen C, Schneider G, *et al.* Molecular Beacons as Diagnostic Tools: Technology and Applications. *Clin Chem Lab Med.* 2003; **41**: 468-474.
151. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons in diagnostics. *F1000 Med Rep.* 2012; **4**: 10.
152. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996; **14**: 303-308.
153. Zhao Y, Park S, Kreiswirth BN, Ginocchio CC, Veyret R, Laayoun A, *et al.* Rapid Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification-Molecular Beacon Platform To Detect Fungal and Bacterial Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol.* 2009; **47**: 2067-2078.
154. Polstra AM, Goudsmit J, Cornelissen M. Development of real-time NASBA assays with molecular beacon detection to quantify mRNA coding for HHV-8 lytic and latent genes. *BMC Infect Dis.* 2002; **2**: 18.
155. McClernon DR, Vavro C, St Clair M. Evaluation of a real-time nucleic acid sequence-based amplification assay using molecular beacons for detection of human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**: 2280-2282.
156. Sidoti F, Bergallo M, Terlizzi ME, Piasentin Alessio E, Astegiano S, Gasparini G, *et al.* Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence-based amplification assay with an internal control using molecular beacon probes for selective and sensitive detection of human rhinovirus serotypes. *Mol Biotechnol.* 2012; **50**: 221-228.

157. Ni W, Le Guiner C, Moullier P, Snyder RO. Development and Utility of an Internal Threshold Control (ITC) Real-Time PCR Assay for Exogenous DNA Detection. *PLoS ONE*. 2012; **7**: e36461.
158. Smits HL, Gussenhoven GC, Terpstra W, Schukink RAF, van Gemen B, van Gool T. Detection, identification and semi-quantification of malaria parasites by NASBA amplification of small subunit ribosomal RNA sequences. *J Microbiol Methods*. 1997; **28**: 65-75.
159. Griffith BP, Rigsby MO, Garner RB, Gordon MM, Chacko TM. Comparison of the Amplicor HIV-1 monitor test and the nucleic acid sequence-based amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus RNA in plasma, serum, and plasma subjected to freeze-thaw cycles. *J Clin Microbiol*. 1997; **35**: 3288-3291.
160. Hollingsworth RC, Sillekens P, van Deursen P, Neal KR, Irving WL. Serum HCV RNA levels assessed by quantitative NASBA: stability of viral load over time, and lack of correlation with liver disease. The Trent HCV Study Group. *J Hepatol*. 1996; **25**: 301-306.
161. De Mendoza C, Koppelman M, Montès B, Ferre V, Soriano V, Cuypers H, *et al*. Multicenter evaluation of the NucliSens EasyQ HIV-1 v1.1 assay for the quantitative detection of HIV-1 RNA in plasma. *J Virol Methods*. 2005; **127**: 54-59.
162. Morre SA, Sillekens PT, Jacobs MV, de Blok S, Ossewaarde JM, van Aarle P, *et al*. Monitoring of *Chlamydia trachomatis* infections after antibiotic treatment using RNA detection by nucleic acid sequence based amplification. *Mol Pathol*. 1998; **5**: 149-154.
163. Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, *et al*. Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia. *J Microbiol Methods*. 2008; **73**: 257-262.
164. Heim A, Schumann J. Development and evaluation of a nucleic acid sequence based amplification (NASBA) protocol for the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid samples. *J Virol Methods*. 2002; **103**: 101-107.
165. Zhang F, Tetali S, Wang XP, Kaplan MH, Cromme FV, Ginocchio CC. Detection of human cytomegalovirus pp67 late gene transcripts in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus type 1-infected patients by Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *J Clin Microbiol*. 2000; **38**: 1920-1925.
166. Smits HL, van Gemen B, Schukink R, van der Velden J, Tjong-A-Hung SP, Jebbink MF, *et al*. Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts. *J Virol Methods*. 1995; **54**: 75-81.
167. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Nucleic-Acid Sequence Based Amplification in the rapid diagnosis of rabies. *Lancet*. 2001; **35**: 892-893.

168. Damen M, Sillekens P, Cuypers HT, Frantzen I, Melsert R. Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. *J Virol Methods*. 1999; **82**: 45-54.
169. Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol*. 2001; **39**: 4506-4513.
170. Wu SJ, Lee EM, Putvatana R, Shurtleff RN, Porter KR, Suharyono W, *et al*. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2001; **39**: 2794-2798.
171. Mahony JB, Song X, Chong S, Faught M, Salonga T, Kapala J. Evaluation of the NucliSens Basic Kit for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genital tract specimens using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification of 16S rRNA. *J Clin Microbiol*. 2001; **9**: 1429-1435.
172. Borst A, Leverstein-Van Hall MA, Verhoef J, Fluit AC. Detection of *Candida* spp. in blood cultures using nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; **39**: 155-160.
173. Borst A, Verhoef J, Boel E, Fluit AC. Clinical evaluation of a NASBA-based assay for detection of *Candida* spp. in blood and blood cultures. *Clin Lab*. 2002; **48**: 487-492.
174. Loeffler J, Hebart H, Cox P, Flues N, Schumacher U, Einsele H. Nucleic acid sequence-based amplification of *Aspergillus* RNA in blood samples. *J Clin Microbiol*. 2001; **39**: 1626-1629.
175. Zhao Y, Park S, Warn P, Shrief R, Harrison E, Perlin DS. Detection of *Aspergillus fumigatus* in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol*. 2010; **48**: 1378-1383.
176. Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*. 1994; **77**: 73-79.
177. Deere D, Porter J, Pickup RW, Edwards C. Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *J Appl Bacteriol*. 1996; **81**: 309-318.
178. Sheridan GE, Szabo EA, Mackey BM. Effect of post-treatment holding conditions on detection of *tufA* mRNA in ethanol-treated *Escherichia coli*: implications for RT-PCR-based indirect viability tests. *Lett Appl Microbiol*. 1999; **29**: 375-379.
179. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. 2003; **53**: 175-183.
180. McKillip JL, Jaykus LA, Drake M. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 1998; **64**: 4264-4268.

181. McKillip JL, Jaykus LA, Drake M. Nucleic acid persistence in heat-killed *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated skim milk. *J Food Prot.* 1999; **62**: 839-844.
182. Van der Vliet GM, Schukkink RA, van Gemen B, Schepers P, Klatser PR. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. *J Gen Microbiol.* 1993; **139**: 2423-2429.
183. Birch L, Dawson C, Cornett J, Keer J. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. *Lett Appl Microbiol.* 2001; **33**: 296-301.
184. Sooknanan R, Malek L, Wang XH, Siebert T, Keating A. Detection and direct sequence identification of BCR-ABL mRNA in Ph+ chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 1993; **21**: 1719-1724.
185. Reitsma PH, van der Velden PA, Vogels E, van Strijp D, Tacken N, Adriaansen H, *et al.* Use of the direct RNA amplification technique NASBA to detect factor V Leiden, a point mutation associated with APC resistance. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* 1996; **7**: 659-663.
186. Romano JW, Shurtliff RN, Grace M, Lee EM, Ginocchio C, Kaplan M, *et al.* Macrophage-derived chemokine gene expression in human and macaque cells: mRNA quantification using NASBA technology. *Cytokine.* 2001; **13**: 325-333.
187. Darke BM, Jackson SK, Hanna SM, Fox JD. Detection of human TNF-alpha mRNA by NASBA. *J Immunol Methods.* 1998; **212**: 19-28.
188. Lambrechts AC, Bosma AJ, Klaver SG, Top B, Perebolte L, van' t Veer LJ, *et al.* Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 ; **56**: 219-231.
189. Brocard C. Sensibilité de la NASBA et efficacité d'un prototype d'extraction automatisé pour l'analyse de la biocontamination fongique environnementale [thèse]. Grenoble: Université Joseph Fourier; 2010.
190. Rosier-Augu P. Étude de la spécificité de la technique NASBA en vue de la mesure de l'aérobiocontamination [thèse]. Grenoble: Université Joseph Fourier; 2009.
191. Norme NF EN 1275. Antiseptiques et désinfectants chimiques-Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques.
192. Recommandations de l'Association pour la Prévention et l'Etude de la Contamination (ASPEC). Etablissements de santé. Classification particulière de l'air. 2010.
193. Hallouin Bernard MC. Air hospitalier : quelle contamination aérienne ? Quel niveau de preuve? 13èmes Journées Nationales d'Infectiologie. 13-15 juin 2012.

194. Statistical guidance on reporting results from studies evaluating diagnostic tests. FDA, U.S. Department of Health and Human Services. 2012.
195. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005; **85**: 257-268.
196. Bergeri I, Michel R, Boutin JP. Pour tout savoir ou presque sur le coefficient kappa. *Médecine Trop.* 2002; **62**: 634-6.
197. Gangneux JP, Bretagne S, Cordonnier C, Datry A, Derouin F, Grillot R, *et al.* Prevention of nosocomial fungal infection: the French approach. *Clin Infect Dis.* 2002; **35**: 343-346.
198. Haugland RA, Vesper SJ, Wymer LJ. Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan™ fluorogenic probe system. *Mol Cell Probes.* 1999; **13**: 329-340.
199. Xu Z, Yao M. Monitoring of bioaerosol inhalation risks in different environments using a six-stage Andersen sampler and the PCR-DGGE method. *Environ Monit Assess.* 2013; **85** : 3993-4003.
200. Brasel TL, Douglas DR, Wilson SC, Straus DC. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Appl Environ Microbiol.* 2005; **71**: 114-122.
201. Pashley CH, Fairs A, Free RC, Wardlaw AJ. DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. *Fungal Biol.* 2012; **116**: 214-224.
202. Surowitz KG, Pfister RM. Variations in levels of cAMP, DNA and RNA in *Streptomyces alboniger* under conditions of aerial mycelium formation and repression. *FEMS Microbiol Lett.* 1985; **26**: 1-4.
203. Brenier-Pinchart MP, Coussa-Rivière L, Lebeau B, Mallaret MR, Bulabois CE. Mobile air-decontamination unit and filamentous fungal load in the hematology ward: how efficient at the low-activity mode? *Am J Infect Control.* 2009; **37**: 680-682.
204. Société Française d'hygiène hospitalière (SF2H). La qualité de l'air au bloc opératoire. Recommandations d'experts. 2004.
205. Robles García M, Dierssen Sotos T, Llorca Díaz FJ, Rodríguez Cundín P, Roiz Mesones MP. Prevention of nosocomial infection of fungal origin: verification of the environmental biosafety in surgery rooms. *Rev Clínica Esp.* 2005; **205**: 601-606.

Annexes

Annexe 1: Résultats des campagnes de prélèvements de surfaces

N° de campagne	Zone étudiée	Points de prélèvements		Résultat de la culture fongique (en UFC /25cm ²)	Résultat de la NASBA Panfungi (en Geq /25cm ²)
Campagne 1	Zone 1	Chambre n°1	Grande table	1	0
			Grande table	0	0
			Table de chevet	2	0
			Télévision	0	1,5
			Table de repas	0	1,36
			Support électrique	0	0
		Chambre n°3	Table	0	0
			Placard	0	0
			Table repas	0	0
			Tableau mural	0	0
			Télévision	0	0
			Support électrique	0	0
		Zone 2	Sas chambre n°1	0	0,9
			Office infirmier	0	0
			Armoire à pharmacie	0	0
		Couloir	Porte	0	0
			Fenêtre	1	2,8
	Zone 3	Hall	Chaises	56	284
			Ascenseur		

Campagne 2	Zone 1	Chambre n°1	Grande table	0	0
			Placard	0	0
			Porte	0	0
			Télévision	0	0
			Téléphone	0	2,5
	Zone 2	Chambre n°2	Table chevet	0	0
			Table repas	0	0
			Support électrique 1	0	0
			Vélo	0	0
			Tableau	0	0
			Support électrique 2	0	0
			Moniteur	0	0
	Zone 2	Sas chambre n°1	Rangement	12	2,9
		Office infirmier	Préparatoire	0	0
			Frigo	2	0
	Zone 3	Couloir	Rambarde métallique	0	4,6
		Hall Ascenseur	Sol	24	126

Campagne 3	Zone 1	Chambre n°1	Table	0	0
			Tableau	0	0
			Chaise	0	0
			Porte sanitaires	0	0
			Téléphone	0	0
			Support métallique (fermeture porte)	0	0
	Zone 2	Chambre n°14	Table repas	0	0
			Télévision	0	0
			Selle vélo	0	0
			Table chevet	0	0
			Support électrique	0	0
			Porte placard	0	0
			Support (rangement)	5	1,26
	Zone 2	Sas chambre n°1	Préparatoire	0	0
		Office infirmier	Bureau	0	0
		Couloir	Placard ménage	0	6,2
	Zone 3	Hall Ascenseur	Armatures chaises	80	50,8

Campagne 4	Zone 1	Chambre n°1	Tiroir table chevet	1	0
			Tableau	0	1,96
			Chaise	0	0
			Matelas	4	11,36
			Télévision	0	0
		Chambre n°2	Tiroir table chevet	0	0
			Table chevet	0	0
			Téléphone	0	0
			Tableau	0	0
			Table (coté fenêtre)	0	0
	Zone 2	Sas chambre n°1 Office infirmier	Support électrique	Invalid	
			Placard	0	0
			Support (rangement)	0	1,38
			Préparatoire	0	0
			Tableau	0	0
	Zone 2	Couloir	Frigo	0	0
	Zone 3	Hall Ascenseur			
			Chaises	45	91,7

Campagne 5	Zone 1	Chambre n°13	Table repas	0	0
			Table chevet	0	0
			Accoudoir chaise	0	0
			Table (proche fenêtre)	0	0
			Pousse seringue électrique	0	0
			Support métallique (fermeture porte)	0	0
		Chambre n°14	Tableau	0	0
			Table chevet	0	0
			Télévision	0	4,17
			Table (proche fenêtre)	0	0
	Zone 2	Sas chambres n°13/14 Office infirmier	Armature lit	1	0
			Radio réveil	0	0
			Placard	0	1,38
			Bureau	0	0
			Support électrique	0	3,55
	Zone 3	Couloir Hall Ascenseur	Chariot infirmier	0	0
			Armature chaise métallique	46	44,46

Campagne 6	Zone 1	Chambre n°5	Table repas	0	0
			Table chevet	0	0
			Tableau	0	0
			Téléphone	0	0
			Réveil	0	0
			Télévision	0	0
		Chambre n°9	Chaise	0	0
			Fenêtre	0	0
			Moniteur	0	0
			Support électrique	0	0
			Armature lit	0	0
			Table chevet	0	0
	Zone 2	Sas chambres n° 9/10	Lavabo	0	0
			Etagère	0	0
		Office infirmier	Préparatoire	1 UFC	2,15
			Armoire	0	0
	Zone 3	Couloir	Salle pause	0	0
		Hall Ascenseur	Sol	21 UFC	7,57

Campagne 7	Zone 1	Chambre n°8	Support électrique	0	0
			Pousse seringue électrique	0	0
			Table	0	0
			Télévision	0	0
			Vélo	0	0
			Table chevet	0	0
		Chambre n°11	Applique lampe murale 1	0	0
			Dispositif fermeture porte	0	0
			Tableau	0	0
			Applique lampe murale 2	Invalid	0
			Table repas	0	0
			Radio réveil	Invalid	0
	Zone 2	Sas chambre n°11/12	Couvercle poubelle	1	0
		Office infirmier	Préparatoire	0	0
			Frigo	1	7,58
	Zone 3	Couloir	Lingerie	0	0
		Hall Ascenseur	Chaise métallique	Non quantifiable	723,83

Campagne 8	Zone 1	Chambre n°1	Téléphone	0	0
			Lavabo	0	0
		Chambre n°11	Applique lampe murale	0	0
			Lit	0	0
			Chaise	0	0
			Table	0	0
			Pédale vélo	Invalid	0
			Robinet douche	16	3,15
			Chaise	2	0
			Dispositif fermeture porte	1	0
	Zone 2	Sas chambre n°11/12	Support électrique	0	0
			Table repas	0	0
		Office infirmier	Support essuie mains	0	0
			Frigo	0	0
			Lavabo	1	1,04
		Couloir	Chariot médecin	0	dnq
		Zone 3	Hall Ascenseur	48	115,68

Campagne 9	Zone 1	Chambre n°1	Porte savon (salle de bain)	0	0
			Chaise	0	0
		Chambre n°5	Tableau (porte brosse)	0	0
			Table de chevet	1	0
			Système fermeture porte	0	0
			Télévision	0	0
			Table de chevet	0	0
			Applique lampe (proche télévision)	0	0
			PSE	0	0
			Support électrique	0	0
	Zone 2	Sas chambres 4/5	Balance	0	1,68
			Poubelle	0	0
		Office infirmier	Tableau	0	0
			Préparatoire	0	0
			Poste informatique	2	2,7
		Couloir	Bureau infirmier	0	1,05
		Zone 3	Hall Ascenseur	54	6,88

Campagne 10	Zone 1	Chambre n°1	Interrupteur (proche porte)	0	0
			Applique lampe	0	0
		Chambre n°7	Support électrique	0	0
			Fenêtre salle de bain	1	14,86
			Rebord fenêtre	4	0
			Grande table	0	0
			Table repas	0	0
			Selle vélo	0	0
			Télévision	0	0
			Monitoring (écran)	0	0
			Appareil step	0	0
			Applique lampe (proche salle de bain)	0	0
	Zone 2	Sas chambres 7/8	Support essuie tout	0	0
		Office infirmier	Armoire	0	0
			Préparatoire	0	0
	Zone 3	Couloir	Chaises	1	0
		Hall Ascenseur	Chaises	26	41,31

Campagne 11	Zone 1	Chambre n°13	Table	0	0
			Accoudoir fauteuil	0	0
			Chaise	0	0
			Système fermeture porte (métal)	0	0
			Appareil Step	0	0
		Chambre n°6	Pédale vélo	0	0
			Support électrique	0	0
			Cuvette toilettes	Invalid	0
			Lavabo	0	1,88
			Applique lampe (proche salle de bain)	0	3,2
	Zone 2	Sas chambre 13/14	PSE	0	0
			Fenêtre	0	0
			Lavabo	0	0
			Armoire pharmacie	0	0
			Poste informatique	0	0
	Zone 3	Couloir	Chariot infirmier	0	0
		Hall Ascenseur	Armatures chaises	Non	443
				quantifiable	

Campagne 12	Zone 1	Chambre n°6	Lavabo	0	0
			Tiroir table de chevet	0	8,99
			Télévision	0	dnq
			Support électrique	0	0
			Applique lampe (proche salle de bain)	0	0
		Chambre n°1	Table (proche fenêtre)	0	0
			Applique lampe (proche salle de bain)	0	dnq
			Base table repas	0	0
			Tiroir table de chevet	0	0
			Téléphone	0	0
	Zone 2	Sas chambre 6	Applique lampe (proche fenêtre)	0	0
			Grande table	0	0
			Etagère	0	0
			Office	0	0
			Préparatoire	0	0
Zone 3	Zone 3	Hall Ascenseur	Armoire solutés et DM	0	0
			SAS visiteurs	1	0
			Sol	Non	78,17
				quantifiable	

Dnq : détectable mais non quantifiable (<1 Geq)

Invalid : résultat exclus de l'étude

Annexe 2 : Résultats des campagnes de prélèvements d'air

N° de campagne	Zone étudiée	Points de prélèvements	Résultat de la culture fongique (en UFC /m ³)	Résultat de la NASBA Panfungi (en Geq /m ³)
Campagne n°1	Zone 1	Chambre n°1	1	2,3
	Zone 2	SAS chambre n°1	1	13,4
		Office infirmier	2	Invalid
Campagne n°2	Zone 1	Chambre n°1	5	0
	Zone 2	SAS chambre n°1	18	26
		Office infirmier	3	1,1
	Zone 3	Hall Ascenseur	36	110
Campagne n°3	Zone 1	Chambre n°1	1	0,9
	Zone 2	SAS chambre n°1	5	3,5
		Office infirmier	1	0
	Zone 3	Hall Ascenseur	56	12
Campagne n°4	Zone 1	Chambre n°1	0	1
	Zone 2	SAS chambre n°1	1	3,4
		Office infirmier	4	0
	Zone 3	Hall Ascenseur	16	23,5
Campagne n°5	Zone 1	Chambre n°13	0	1,69
	Zone 2	SAS chambres n°13/14	2	0
		Office infirmier	5	6
	Zone 3	Hall Ascenseur	Non quantifiable	Invalid
Campagne n°7	Zone 1	Chambre n°8	0	0
	Zone 2	SAS chambre n°11/12	3	2,77
		Office infirmier	9	44,14
	Zone 3	Hall Ascenseur	25	Invalid

Campagne n°8	Zone 1	Chambre n°1	4	Invalid
	Zone 2	SAS chambre n°11/12	6	1,7
		Office infirmier	1	1,84
	Zone 3	Hall Ascenseur	31	15,81
Campagne n°9	Zone 1	Chambre n°1	1	6,15
	Zone 2	SAS chambres n°4/5	2	4,51
		Office infirmier	4	3,79
	Zone 3	Hall Ascenseur	18	32,76
Campagne n°10	Zone 1	Chambre n°1	0	0
	Zone 2	SAS chambres n°7/8	3	0
		Office infirmier	3	7,3
	Zone 3	Hall Ascenseur	13	235
Campagne n°11	Zone 1	Chambre n°6	1	23,5
	Zone 2	SAS chambres n°13/14	8	8,89
		Office infirmier	4	8,9
	Zone 3	Hall Ascenseur	43	213
Campagne n°12	Zone 1	Chambre n°6	0	Invalid
	Zone 2	SAS chambre n°6	1	2,2
		Office infirmier	3	6,61
	Zone 3	Hall Ascenseur	19	14,25

La campagne n°6 ne comporte pas de prélèvement d'air.

Annexe 3: Prélèvements non détectés par la NASBA et
positifs en culture fongique

	Zone 1	Zone 2
Colonies fongiques détectées sur les prélèvements de surfaces (n° de la campagne de prélèvements correspondante)	1 UFC de <i>Penicillium</i> sp (n°1) 2 UFC dont 1 <i>Cladosporium</i> sp (n°1) 1 UFC champignon non identifié (n°4) 1 UFC de <i>Penicillium</i> sp (n°5) 2 UFC dont 1 <i>Cladosporium</i> sp (n°8) 1 UFC de <i>Penicillium</i> sp (n°8) 1 UFC d'<i>Alternaria</i> sp (n°9) 4 UFC dont 2 dématiés (n°10)	2 UFC de dématiés (n°2) 1 UFC de dématié (n°7) 1 UFC de <i>Cladosporium</i> sp (n°10) 1 UFC champignon non identifié (n°12)
Colonies fongiques détectées sur les prélèvements d'air (n° de la campagne de prélèvements correspondante)	5 UFC dont 4 <i>Cladosporium</i> sp (n°2)	1 UFC champignon non identifié (n°3) 4 UFC dont 1 <i>Cladosporium</i> sp, 2 <i>Penicillium</i> sp (n°4) 2 UFC dont 1 <i>Penicillium</i> sp (n°5) 3 UFC dont 1 <i>Penicillium</i> sp, 1 <i>Cladosporium</i> sp (n°10)

Annexe 4: Communication scientifique

Les résultats des 12 campagnes de prélèvements de surfaces réalisés dans le cadre de cette étude ont été associés à ceux réalisés entre le 13/01/11 et le 27/04/11 dans l'unité d'onco-hématologie du CHU de Grenoble par G. Szymanski, interne en Biologie Médicale dans Laboratoire de Parasitologie Mycologie.

L'ensemble de ces travaux a été publié dans la revue *Medical Mycology*¹ et présenté dans un congrès international².

¹ Brenier-Pinchart M.P., Abaibou H., Berendsen T., Szymanski G., Beghri M., Bailly S., Lasnet F., Thiebaut-Bertrand A., Mabilat C., Pelloux H. Usefulness of Pan-fungal NASBA test for surveillance of environmental fungal contamination in a protected hematology unit. *Medical. Mycol.*, 2014; sous presse.

² Brenier-Pinchart M.P., Abaibou H., Szymanski G., Beghri M., Berendsen T., Lasnet F., Thiebaut-Bertrand A., Mabilat C., Pelloux H. Fungal environmental control : usefulness of a Pan-fungi NASBA in a protected haematology unit. 22th *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Londres (Angleterre), 30 Mars- 3 Avril 2012.

*Faculté de Pharmacie,
Université Joseph Fourier Grenoble I.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».